

EXPERIENTIA



REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores:

R. MATTHEY · A. v. MURALT · L. RUZICKA · J. WEIGLE
Lausanne Bern Zürich Genève-Pasadena

Redactor: H. MISLIN, Basel-Mainz

VERLAG BIRKHÄUSER AG · BASEL 10

SUISSE — SCHWEIZ — SVIZZERA — SWITZERLAND

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY
AUG 20 '54

SOMMAIRE - INHALT - SOMMARIO - CONTENTS

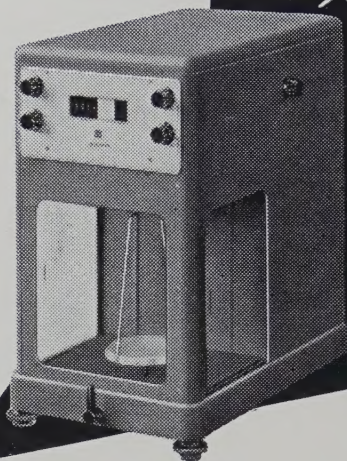
- R. MARBET und A. WINTERSTEIN: Neuere Auffassungen über den Mechanismus der Blutgerinnung. 273
A. STOLL: Sur les substances cardiotoniques de la scille maritime (*Scilla maritima* L.) 282

Brèves communications - Kurze Mitteilungen - Brevi comunicazioni - Brief Reports

- F. E. BADER, D. F. DICKEL, R. A. LUCAS, and E. SCHLITTLER: Rauwolfia Alkaloids, XI. Isolation of an Isomer of Yohimbine 298
C. H. EUGSTER und P. G. WASER: Zur Kenntnis des Muscarins 298
H.-J. BIELIG und E. BAYER: Über die Molekulargröße des Hämovanadins 300
L. LASZT: Über die Natur des Leberglykogens normaler und diabetischer Tiere unter verschiedenen Bedingungen 302
H. RYSER, H. AEBI und A. ZUPPINGER: Veränderungen in der Mitochondrienfraktion der Rattenleber nach Total- und Leberfeldbestrahlung (1000 r) 304
PAULETTE VIGNAIS et P. VIGNAIS: Inhibition sélective de quelques enzymes respiratoires chez *Escherichia coli* 305
C. V. RAMAKRISHNAN: Spectrophotometric Method for Estimating Enzymatic Synthesis of Butyl Oleate 308
R. RICHTERICH-VAN BAERLE, H. H. WOTIZ, and H. M. LEMON: Enzymatic Conversion of Testosterone to Androstenedione by Human Serum 308
H. MOUSSATCHÉ: On the Nature of Some Smooth Muscle Active Substances from the Platelets 309
A. WOLLENBERGER: Non-Specificity of the Effect of Cardiac Glycosides on the Polymerization of Actin 311
E. DE BERARDINIS: Sull'ossidazione dell'acido lattico ed acido piruvico e di alcuni componenti del ciclo citrico in omogenati di epitelio corneale 312
C. G. BERNHARD and E. BOHM: Cortical Representation of the Cortico-Motoneuronal System in Monkeys 312
M. BEHRENS und H. R. MARTI: Die Isolierung eosinophiler Leukozyten und ihrer Granula (Pro Experimentis) 315

für den Erfolg entscheidend

ist die moderne Ausrüstung Ihres Laboratoriums. Dazu gehört in erster Linie die METTLER Analysenwaage. Wegen ihrer Genauigkeit und einfachen Bedienung ist sie auf der ganzen Welt zum Begriff geworden. Verlangen Sie bitte eine unverbindliche Demonstration.



Mettler

ANALYSENWAAGE



E. METTLER ZÜRICH 1 SCHWEIZ PELIKANSTR. 19 TEL. (051) 25 25 70

Verzeichnis der Inserenten – Liste des annonceurs – List of Advertisers – Experientia X/7

Adroka AG., Basel
Dr. Bender & Dr. Hobein AG., Zürich
Ciba AG., Basel
Ganz & Co., Zürich
J. R. Geigy AG., Basel

F. Hoffmann-La Roche & Cie., Basel
Kern & Co. AG., Aarau
Lonza AG., Basel
E. Mettler, Zürich
PAA, Pan American

Salvis AG., Luzern
Sandoz AG., Basel
Sauter AG., Basel
Verlag Benno Schwabe & Cie., Basel
H. Wild AG., Heerbrugg

Die EXPERIENTIA kann in folgenden Ländern durch die Post abonniert werden:

Des abonnements pour EXPERIENTIA peuvent être commandés près des bureaux de postes des pays suivants:

Italien
Deutschland

Belgien, Luxemburg
Holland

Dänemark
Norwegen

Schweden
Finnland

Portugal
Marokko

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an 32 francs pour la Suisse; pour l'étranger 38 francs. Ces prix s'entendent en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt in der Schweiz Fr. 32.-, im Ausland sFr. 38.-.

Inserationspreise: $\frac{1}{1}$ Seite Fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ Seite Fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ Seite Fr. 77.-. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può esser richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 32.- per la Svizzera; all'estero fr. 38.-. I prezzi vanno intesi in valuta svizzera.

EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription by inland mail is fr. 32.-; other countries fr. 38.-. Prices in Swiss currency.

Prices for advertising: $\frac{1}{1}$ page fr. 220.-, $\frac{1}{2}$ page fr. 132.-, $\frac{1}{4}$ page fr. 77.-. Advertisements should be sent to the publishers.

Copyright 1954 by Verlag Birkhäuser AG., Basel 10 (Schweiz), Elisabethenstrasse 15, Telefon (061) 24 98 00; Telegrammadresse: Edita Basel

Printed in Switzerland by E. Birkhäuser & Cie. AG., Basel

NEUES **ZEISS-WINKEL** STANDARD-MIKROSKOP GF 625

Das Ergebnis einer hundertjährigen Tradition !

- Lichtstarke Einbaubeleuchtung (Köhlersches Prinzip) für subjektive Beobachtung und Mikrophotographie
- Tiefliegende, coaxial gelagerte Triebknöpfe für Grob- und Feineinstellung
- Grosser Kreutztisch mit coaxial gelagerten, links- und rechtsseitig angebrachten Triebknöpfen
- Vollkommener Präparatschutz durch gefederte Fassung der Objektive
- Vergrößerungswechsler für die Okulare (ohne Okularwechsel)
- Schlittenrevolver für fünf Objektive
- Vereinigter Hellfeld-Phasenkontrast-Dunkelfeld-Kondensor
- Neue Achromate und Neofluare mit dezimal-geometrischer Abstufung der Vergrößerungen

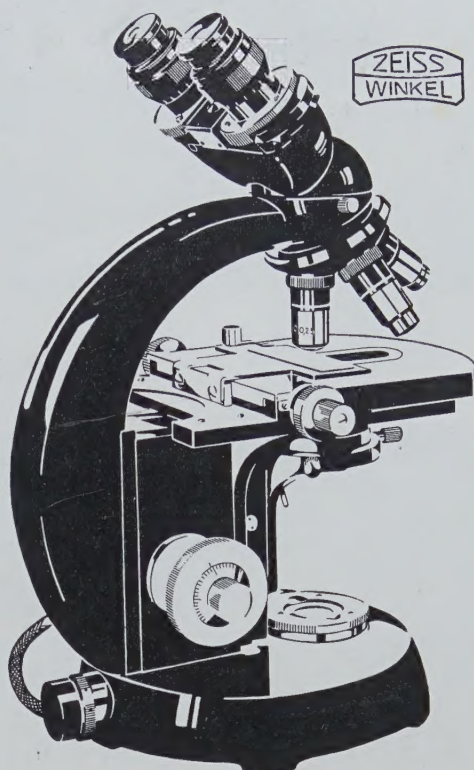
Auskunft und Vorführung durch die
Generalvertretung für die Schweiz:

Verlangen Sie bitte
Prospekt
Nr. ZW/502/E

GANZ & Co

BAHNHOFSTR. 40
TEL(051) 23 97 73

Zürich



PENTRIT

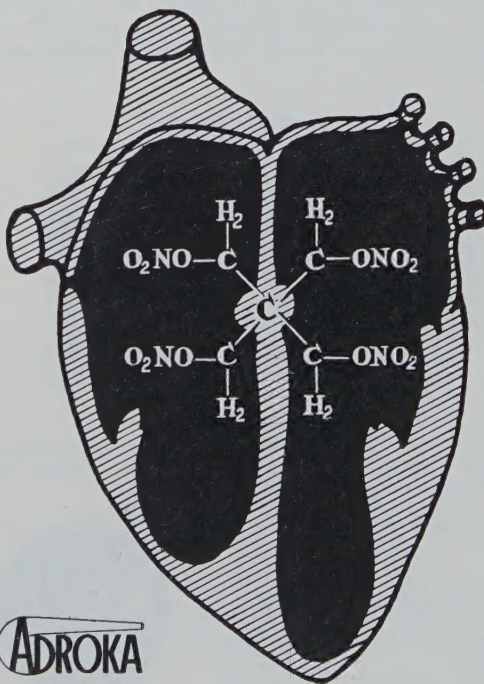
ADROKA AG., BASEL

Penta-Erythrol-Tetranitrat, das seit 1946 in vielen Ländern immer wieder bewährte Spezifikum bei *Angina pectoris*.

Tétranitrate de penta-érythrol, le spécifique pour le traitement de l'*angine de poitrine*. Approuvé et introduit depuis 1946 dans beaucoup de pays.

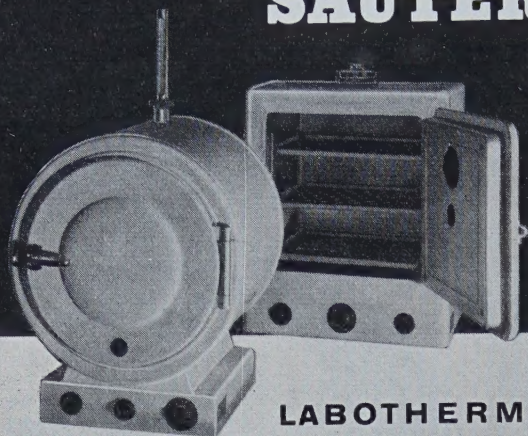
Tetranitrato del penta-eritrolo, il specifico contro l'*angina pectoris*. Approvato e introdotto in molti paesi già dal 1946.

Penta-erythrol tetranitrate, the specific remedy for the treatment of *angina pectoris* approved since 1946 in many countries.



ADROKA

SAUTER



LABOTHERM

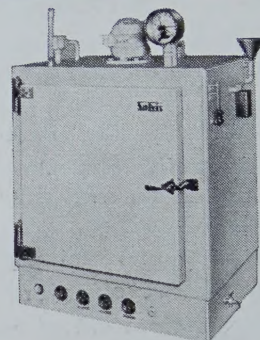
Elektr. Wärmeschränke für Laboratorien

Prüfchränke für Farben und Lacke
Härteprüfung von Kunststoffen
Dichte-Feuchtigkeit-Säuregehalt-
prüfungen, Vorwärmung u.s.w.
Trockenschränke, Sterilisatoren
Brut- und Labschränke, Vakuumschränke

FR. SAUTER A.G.,
FABRIK ELEKTRISCHER APPARATE, BASEL

Elektrische Wärmegegeräte
für Laboratorien

Elektrische
Klima-
schränke

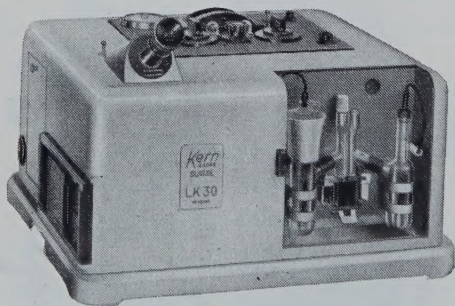


Salvis

SALVIS AG. Luzern-Emmenbrücke
Fabrik elektrischer Apparate

Mikro-Elektrophoreseapparat Kern Modell LK 30

mit interferometrischer Ausmessung der Konzentrationsstufen.
Exakte und zuverlässige Resultate mit kleinen Substanzmengen
(0,4 ccm einer 1-2%igen Lösung). Photographische Registrie-
rung beider Zellkanäle, einfache Bedienung und Auswertung,
rasches Arbeiten. Visuelle Überwachung der Fraktionierung,
automatische Bildnumerierung. Spezialzelle für Diffusionsver-
suche.

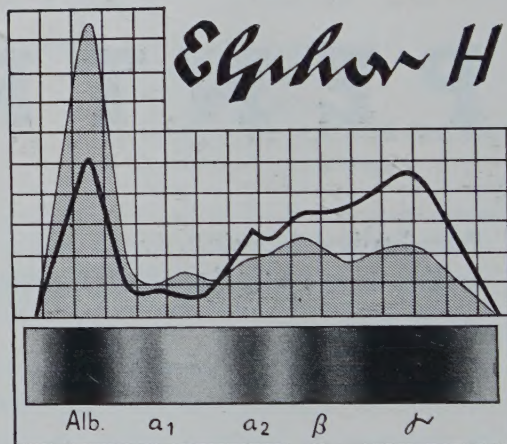


Anwendungen: Serum und Plasma, Rückenmarkliquor, Organ-
Eiweisse, Fermente, Immunisierungsvorgänge, Chemie der
Hochmolekularen usw.

Prospekt Med. 505 auf Verlangen.

Kern & Co. AG., Aarau

Werkstätten für Präzisions-Mechanik
und Optik Gegründet 1819
Tel. (064) 21112 Telegr. Kern Aarau



ELEKTROPHORESE

auf Papier zur Analyse der
Plasma- und Serumproteine

Ein einfacher, schneller und sicherer Weg zur Diagnosti-
zierung und Beurteilung des Verlaufs zahlreicher Erkran-
kungen der Leber, der Niere, des Knochenmarks und
Lymphdrüsen systems, septischer und tuberkulöser Pro-
zesse.

Die moderne Mikromethode auch für experimentelle
Untersuchungen und für Kleinterversuche.

Verlangen Sie nähere Einzelheiten und Literaturnachweis.

DR. BENDER & DR. HOBEIN AG.
ZÜRICH 6/42

Telephon (051) 26 17 77 - Riedtlistrasse 15a

Das große
WILD-Mikroskop
Stativ M 10



Ein hochwertiges Schweizer Präzisionsinstrument mit leistungsfähiger Optik und zahlreichem, erstklassigem Zubehör für Phasenkontrast, Varicolor, Mikrophotographie, Dunkelfeld, Auflicht, Projektion, Polarisation, Blaulichtfluoreszenz.

WILD
HEERBRUGG



Middle East, India, Far East, Round-the-World

Fly on luxurious Round-the-World Clippers

● This could be you – enjoying the individual attention of courteous Clipper* attendants, savoring the gourmet perfection of cuisine by *Maxim's of Paris* served aloft, your choice of drinks, settling back in a reclining lounge chair in a perfectly air-conditioned and pressurized cabin... as your Round-the-World Clipper sings along *over* the weather at more than five miles per minute! Later, your foamsoft berth will be ready – a limited number are available for a small surcharge.

Connecting flights from Zurich or Geneva to Istanbul and Beirut, where you board a giant new Super-6 Clipper of the *Asia Express* to Karachi, Delhi, Bangkok, Hong Kong and Tokyo. Other Super-6 Clippers also stop at Basra, Calcutta and Rangoon. **Call your Travel Agent.**



PAA
PAN AMERICAN

WORLD'S MOST EXPERIENCED AIRLINE
1 St.-Peter-Strasse, Zurich Tel. (051) 23 77 04

* Trade-Mark, Reg. U. S. Pat. Off.

Biochemica «Roche»

Für die wissenschaftliche Forschung
stehen im Rahmen der **Biochemica**
«Roche» über **300** Verbindungen zur
Verfügung

Hämatologie, Blutgerinnung

Liquoid «Roche», Heparin

2-Dimethylaminomethyldibenzofuran zur Bestimmung des Uroheparins

Antithrombin-Reagens «Roche» zur Heparinbestimmung

Protamin-Sulfat

Dicumarol

Thrombokinase, Thromboplastin-Lösung «Roche»

Thrombin

Vitamin K₁

Vitamin B₁₂

Hämin, Bilirubin

Ferner: Vitamine, Vitaminbausteine und verwandte Verbindungen, Aminosäuren, Peptide, Alkanolamine, Alkylamine, Heterocyclische Amine, Phenylalkylamine, Zucker, Zuckeralkohole, Carbonsäuren, Sterine, Gallensäuren, Gallenfarbstoffe, Carotinoide, Herzglykoside, Purinderivate, Pyrimidinderivate, Pterine, Pflanzenschutzstoffe, krebserregende Substanzen.

Weitere Reagenzien und Hilfsmittel für biologische
und klinische Untersuchungen

Zustellung des Biochemica-Kataloges
mit Preisliste durch

**F. Hoffmann-La Roche
& Co. AG., Basel**

Biochemische Abteilung

Neuere Auffassungen über den Mechanismus der Blutgerinnung¹

Von R. MARBET und A. WINTERSTEIN, Basel²

Die Erforschung des Blutgerinnungsmechanismus hat in den letzten Jahren durch die Einführung verschiedener die Blutgerinnung hemmender oder fördernder Präparate in die Therapie einen starken Impuls erfahren. Dabei gelang die Entdeckung neuer Gerinnungsfaktoren, was wiederum Wesentliches zum Verständnis der Wirkungsweise dieser oft lebensrettenden Medikamente beigetragen hat.

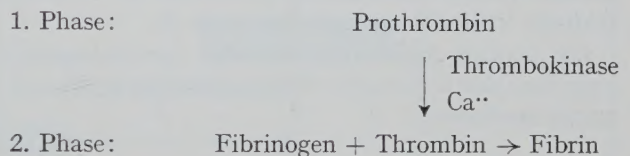
Die Tatsache, dass sich die verschiedenen Forschergruppen bis heute bezüglich der Nomenklatur auf diesem Gebiet noch nicht einigen konnten und dass auch bezüglich der Deutung mancher Reaktionen noch fast unüberbrückbare Divergenzen bestehen, möchten wir auf die ganz besonderen Schwierigkeiten, denen man beim Arbeiten über die Blutgerinnung gegenübersteht, zurückführen.

Ein Versuch, die wichtigsten Tatsachen und Anschauungen über den Gerinnungsmechanismus schematisch vereinfacht zusammenzufassen, erscheint uns gerechtfertigt im Hinblick auf die rasch zunehmende Bedeutung dieser Forschungsrichtung, die sich zur Zeit vor allem auf die Behandlung von Thrombose und Embolie erstreckt.

Historischer Rückblick

MALPIGHI³, der 1683 erstmals gewaschenes Blutgerinnsel mikroskopisch untersuchte, gilt als Entdecker des Fibrins. DENIS⁴ gelang es 1859, durch Sättigung von Plasma mit Kochsalz die lösliche Form des Fibrins zu isolieren, die er *Plasmin*, später *Fibrinogen* nannte. BUCHANAN⁵ erkannte die Anwesenheit eines

gerinnungsfördernden Fermentes im frischen Serum, das sogenannte *Buchanan-Enzym*, welches später von SCHMIDT *Thrombin* genannt wurde. SCHMIDT¹ postulierte die Anwesenheit einer inaktiven Vorstufe des Thrombins im Blute, die er als *Prothrombin* bezeichnete. Dieser Forscher beschrieb auch die gerinnungsfördernde Wirkung von Gehirnextrakt, den er *Zymoplastin* nannte, was dem heutigen *Thromboplastin* (Thrombokinasen) entspricht. MORAWITZ², der auch die Bedeutung des Calciumions richtig erfasste, stellte im Jahre 1905 das folgende, klassisch gewordene Gerinnungsschema auf.



In den folgenden 30 Jahren bemühte sich die Forschung im wesentlichen, den Gerinnungsvorgang als kolloid-chemisches Phänomen zu erklären. Im Jahre 1934 setzte die moderne Epoche der Gerinnungsforschung ein. Sie ist charakterisiert durch die Tatsache, dass sich theoretische Erkenntnisse mehr und mehr therapeutisch auswerten lassen. In diesem Sinne ist als wichtiger Markstein die sogenannte Prothrombinbestimmung nach QUICK³ zu nennen, welche die Arbeiten über Dicumarol und Vitamin K in entscheidender Weise gefördert hat.

Das klassische Gerinnungsschema wurde zunächst durch OWREN⁴ in dem Sinne erweitert, dass er den 4 bekannten Gerinnungsfaktoren – Fibrinogen (I), Prothrombin (II), Thromboplastin (III) und Ca⁺⁺ (IV) – den Faktor V anfügte. Dieser ist in seiner aktivierten Form, dem Faktor VI, für die Umwandlung von

¹ 9. Mitteilung über Probleme der Blutgerinnung. – 8. Mitteilung siehe R. MARBET und A. WINTERSTEIN, *Die Medizinische* 1954, 877.

² Wissenschaftliche Laboratorien der Firma F. Hoffmann-La Roche & Cie., AG., Basel.

³ M. MALPIGHI, *Exercitationes de structura viscerum, cum dissertatione de polypocordis* (Boston Medical Library, Frankfurt 1683), S. 194, zitiert aus: B. S. SALIBI, *Surgery Gynecology* 95, 105 (1952).

⁴ P. S. DENIS, *Mémoire sur le sang considéré quand il est fluide, pendant qu'il se coagule, et lorsqu'il est coagulé* (Paris 1859), zitiert aus: B. S. SALIBI, *Surgery Gynecology* 95, 105 (1952).

⁵ A. BUCHANAN, *Lond. M. Gaz.* 18, 50 (1836), zitiert nach B. S. SALIBI, *Surgery Gynecology* 95, 105 (1952).

¹ A. SCHMIDT, *Zur Blutlehre* (Leipzig 1892). Weitere Beiträge zur Blutlehre (Wiesbaden 1895).

² P. MORAWITZ, *Ergebn. Physiol.* 4, 307 (1905).

³ A. J. QUICK, *Amer. J. Med. Sci.* 190, 501 (1935).

⁴ P. OWREN, *Acta Med. Scand.* 194, 1 (1947).

Prothrombin in Thrombin erforderlich. In Fortsetzung der Owrenschen Numerierung bezeichnete KOLLER¹ einen weiteren, erst vor wenigen Jahren von verschiedenen Forschern² entdeckten Akzelerator der Prothrombinumwandlung als *Faktor VII*.

Die nähere Untersuchung der als Hämophilie bezeichneten hämorrhagischen Diathese zeigte, dass die Auffassung von BORDET und DELANGE³, wonach das Blutthromboplastin nur aus den Thrombocyten stamme, nicht ganz zutreffend ist. Wohl sind die Thrombocyten für die Bildung des Blutthromboplastins nötig; sie wirken jedoch nur in Verbindung mit weiteren Plasmafaktoren, dem antihämophilen Globulin = *Faktor VIII* und dem sogenannten Christmas-Faktor = *Faktor IX*. In neuester Zeit postuliert KOLLER⁴ den *Faktor X*, der ebenfalls an der Bildung des Blutthromboplastins beteiligt sein soll.

Die neuere Forschung zeigt somit, dass das Morawitzsche Schema in zwei Punkten zu erweitern ist:

1. Die «klassische Prothrombinwirkung» ist nicht einem einheitlichen Faktor zuzuschreiben, sondern einem Komplex von 3 Faktoren, der neben dem eigentlichen Prothrombin noch die Faktoren V und VII umfasst, zwei Proteine, welche die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin beschleunigen.

2. Die Wirkung des Blutthromboplastins kommt ebenfalls durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren zustande, nämlich Plättchenfaktor 3 sowie den Plasmafaktoren VIII, IX und wahrscheinlich X.

Die heutige Auffassung über den Gerinnungsvorgang lässt sich in einfacher Weise in folgendem Schema zusammenfassen:

¹ F. KOLLER, A. LÖLIGER und F. DUCKERT, *Acta Haematol.* 6, 1 (1951).

² Literatur siehe R. BIGGS und R. G. MACFARLANE, *Human Blood Coagulation*, Blackwell Scientific Publications (Oxford 1953).

³ J. BORDET und L. DELANGE, *Ann. Inst. Pasteur* 26, 655, 739 (1912).

⁴ F. KOLLER, *Unser gegenwärtiges Wissen über die beschleunigenden Faktoren bei der Umwandlung des Prothrombins*, 4. Kongress der Europ. Hämatol. Ges. Amsterdam 1953, 8.-12. September.

1. Phase: Prothrombin (II)

Plättchenfaktor 3
AHG (VIII)
Christmas-Faktor (IX)
Faktor X?

Thromboplastin (III)
Ca⁺⁺ (IV)
Faktor V → VI
Faktor VII

2. Phase:

Fibrinogen (I) + Thrombin → Fibrin

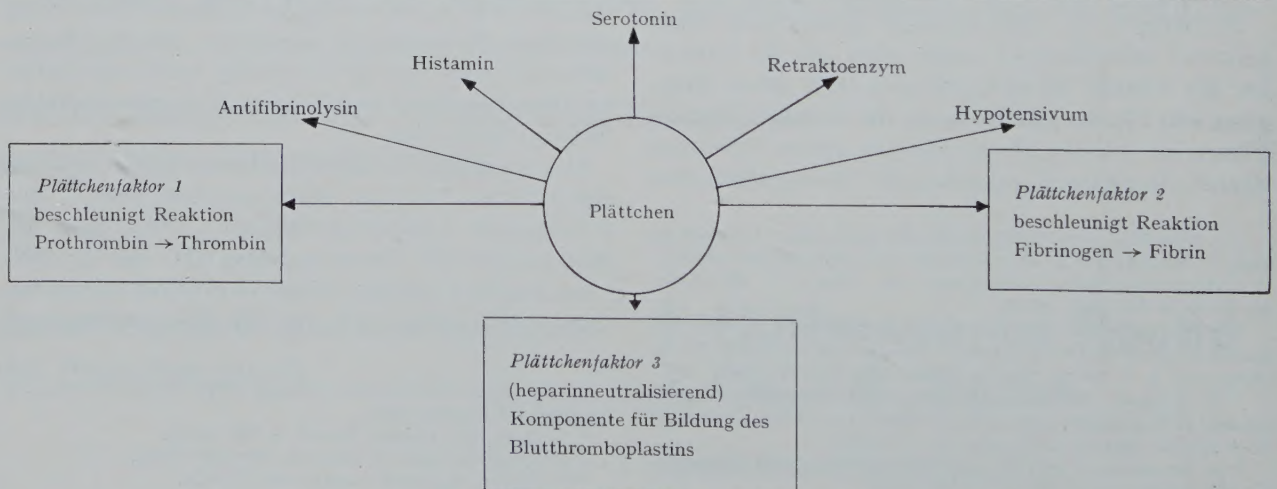
Neues Gerinnungsschema

In dem von uns entwickelten Gerinnungsschema¹ haben wir die klassische Theorie durch starke Punktlinien und schwarze Felder besonders hervorgehoben. Um diese lassen sich nun zwanglos die Ergebnisse der neueren Forschung, das heisst die gerinnungsfördernden Faktoren V bis X, gruppieren. Ein physiologischer Mechanismus von derart vitaler Bedeutung wie die Blutgerinnung ist aber undenkbar ohne entsprechende Gegenregulation. Es sind dementsprechend neben den gerinnungsfördernden Faktoren auch die Inhibitoren in das Schema einzufügen. Um ihre grosse praktische Bedeutung zu unterstreichen, haben wir die gerinnungshemmenden Substanzen durch graue Kreise, deren Wirkung durch graue Striche hervorgehoben. Es kommt auf diese Weise zum Beispiel die polyvalente Wirkung des Heparins recht anschaulich zum Ausdruck.

Das starre Schema erlaubt es nicht, die von uns² schon früher als bedeutsam unterstrichene dynamische Seite des Problems zu veranschaulichen. Die besonders wichtige autokatalytische Wirkung des Thrombins

¹ Erste Fassung siehe A. WINTERSTEIN, *Bruxelles-Médical* 31, 69 (1951).

² A. WINTERSTEIN, *Bruxelles-Médical* 30, 66 (1950).



Klassische Theorie
1905

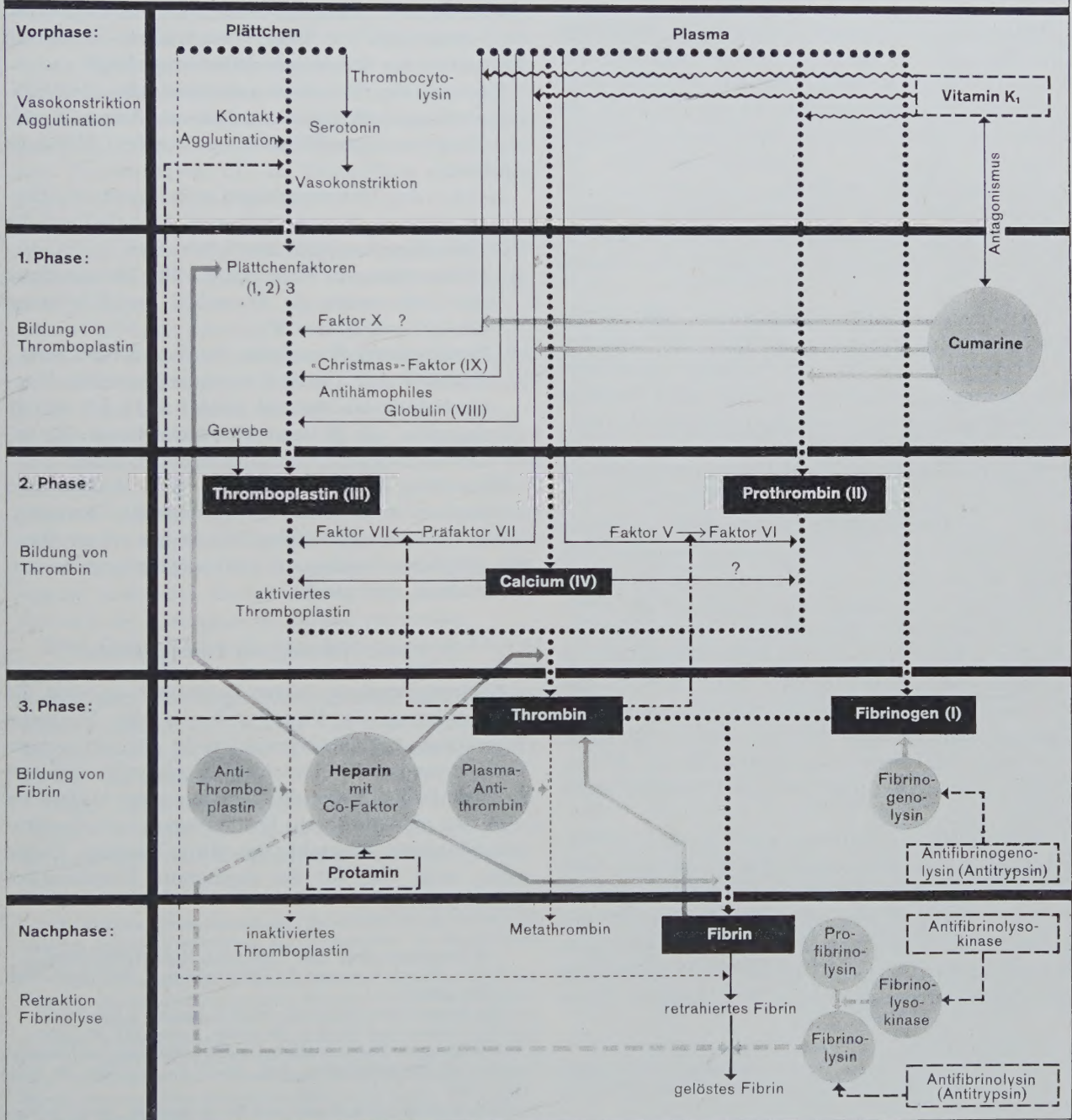
Gerinnungsschema

Inhibi-
toren

1954

Marbet-Winterstein

- Antagonisten
- - - Autokatalyse
- Nebenreaktionen
- ~~~~~ Faktorenbildung



Interessenten stellen wir das obenstehende Schema gerne im Dreifarbendruck zur Verfügung

haben wir jedoch berücksichtigt und durch ---- gekennzeichnet.

Bezüglich der Aufteilung des Gerinnungsprozesses in verschiedene Phasen halten wir uns an das vor 5 Jahren entwickelte Schema; das heisst, wir erweitern das klassische Schema durch die Hauptphase der Thromboplastinbildung und fügen zudem eine Vorphase (Plättchenwirkung) und eine Nachphase (Fibrinabbau) an (Seite 275).

Vorphase: Vasokonstriktion und Agglutination

BIZZOZERO¹ hat als erster die einzigartige Bedeutung der Plättchen im physiologischen Geschehen der Hämostase und für die Pathogenese der Thrombose erkannt. Sie greifen regulierend in praktisch alle Phasen der Gerinnung ein. Dank ihren besonderen physikalisch-chemischen Qualitäten und ihrer Agglutinationsfähigkeit erscheinen sie zunächst als das geeignetste Blutelement für den direkten Wundverschluss. Die Plättchen enthalten aber zudem Wirkstoffe, die wichtigste physiologische Aufgaben zu erfüllen haben.

Die komplexe Funktion der Plättchen ergibt sich in Ergänzung zum Schema aus der Übersicht Seite 274.

Die verschiedenen in der Übersicht angeführten Stoffe kommen erst nach einer Alteration der Plättchen zur Wirkung, das heisst nach Agglutination oder Kontakt mit gewissen Oberflächen.

Nach BRINKHOUS² findet bei diesem Kontakt eine Aktivierung des sogenannten *Thrombocytolysins* statt, welches die Plättchenhülle zerstört. Über die Natur dieses Wirkstoffes ist nichts Näheres bekannt. Wir halten es für denkbar, dass Histamin oder eine histaminähnliche Verbindung bei der Alteration der Plättchen eine Rolle spielt. Aus den durch elektronenmikroskopische Aufnahmen gut gestützten Versuchen von JÜRGENS und BRAUNSTEINER³ geht hervor, dass Histamin tatsächlich Plättchenagglutination auslöst. Das aus einem einzigen Plättchen austretende Histamin könnte im Sinne einer Kettenreaktion die Zerstörung einer grossen Zahl weiterer Plättchen herbeiführen.

Beim Zerfall der Plättchen wird *Serotonin* (5-Oxytryptamin), ein hochaktiver *Vasokonstriktor*, frei⁴, welcher durch Verengerung verletzter Gefässe die austretende Blutmenge verkleinert. M. B. ZUCKER⁵ und H. D. ZUCKER⁶ haben gezeigt, dass die Gefässkontraktion schon 15 sek nach der Läsion auftritt und nach 1 min eine Lumenverengung bis zu 80% bewirkt. Durch

diesen Effekt wird auch eine Verstopfung verhältnismässig grosser Gefässe durch agglutinierte Plättchen ermöglicht.

Der Feststellung von STEFANINI¹, wonach diesem Mechanismus für eine erste Phase der Hämostase eine ganz besondere Bedeutung zukommt, möchten wir uneingeschränkt beistimmen. Eine ungenügende Kontraktibilität der Gefässe scheint auch bei der von WILLEBRAND-JÜRGENS² beschriebenen konstitutionellen Thrombopathie («Pseudohaemophilie») eine Rolle zu spielen.

Ein weiterer Plättchenfaktor, das *Retraktoenzym*, wird neuerdings von FONIO³ beschrieben. Es soll die Retraktion des Blutgerinnsels bewerkstelligen.

Dem aus den Plättchen entstammenden *Antifibrinolyse* kommt offenbar die Aufgabe zu, das am Wundverschluss beteiligte Fibrin *in loco* vor dem Abbau zu schützen.

Gemäss den Untersuchungen von CREVELD⁴, JÜRGENS⁵, SEEGER⁶ und STEFANINI¹ enthalten die Plättchen 3 gerinnungsaktive Substanzen:

- a) *Plättchenfaktor 1* beschleunigt die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin (möglicherweise identisch mit Faktor V).
- b) *Plättchenfaktor 2* verstärkt die Thrombinwirkung.
- c) *Plättchenfaktor 3* stellt einen thromboplastinbildenden Faktor dar, der mit Faktor VIII, IX und X reagierend das Blutthromboplastin liefert. Er besitzt auch heparinneutralisierende Wirkung⁷.

Dem Mangel an verschiedenen Plättchenfaktoren entsprechen verschiedene hämorrhagische Diathesen, die sich gerinnungsphysiologisch mit den entsprechenden Plättchendefekten in Einklang bringen lassen. Siehe hierzu STEFANINI¹.

1. Phase: Bildung von Thromboplastin

Noch vor wenigen Jahren nahm man an, dass die Thrombokinasen von MORAWITZ⁸ bzw. das NOLFSche Thromboplastin⁹ eine chemisch recht gut definierbare Verbindung darstelle, bestehend aus einem Phosphatidanteil und einem Eiweisskörper. Die neuere Auffassung lehrt nun, dass dies wohl für das sogenannte Gewebsthromboplastin (Extrakte aus Hirn, Plazenta, Lunge usw.), nicht aber für das sogenannte Blutthromboplastin zutrifft.

¹ M. STEFANINI, Bull. New York Acad. Med. 30, 239 (1954).

² E. A. WILLEBRAND und R. JÜRGENS, Dtsch. Arch. klin. Med. 175, 453 (1933).

³ A. FONIO, Proc. int. Congr. int. Soc. Hemat. 3, 523 (1950).

⁴ S. CREVELD und M. M. P. PAULSEN, Lancet 262, 23 (1952).

⁵ R. JÜRGENS, Die Blutplättchen und ihre Bedeutung für Blutungsneigung und Thrombinbildung, Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 58. Kongress 1952.

⁶ A. G. WARE, J. L. FAHEY und W. H. SEEGER, Amer. J. Physiol. 154, 140 (1948).

⁷ Die weitere Untersuchung des Plättchenfaktors 3 dürfte wohl noch zu Modifikationen der jetzigen Auffassung führen.

⁸ P. MORAWITZ, Ergebn. Physiol. 4, 307 (1905).

⁹ P. NOLF, Arch. internat. Physiol. (Liège) 6, 1 (1908).

¹ J. BIZZOZERO, Arch. path. Anat. 90, 261 (1882).

² K. M. BRINKHOUS, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 66, 117 (1947).

³ R. JÜRGENS und H. BRAUNSTEINER, Schweiz. med. Wschr. 80, 1388 (1950).

⁴ M. M. RAPPORT, J. Biol. Chem. 180, 961 (1949). Siehe auch: J. T. CORREL, L. F. LYTEN, S. LONG und J. C. VANDENPOEL, Amer. J. Physiol. 169, 537 (1952).

⁵ M. B. ZUCKER, Amer. J. Physiol. 148, 275 (1947).

⁶ H. D. ZUCKER, Blood 4, 631 (1949).

Letzteres stellt vielmehr das Reaktionsprodukt aus Plättchenfaktor 3 mit antihämophilem Globulin und Christmas-Faktor dar. Nach Auffassung von KOLLER¹ ist für die Bildung des Blutthromboplastins noch Faktor X² erforderlich.

Über den Mechanismus der Blutthromboplastinbildung dürfte der in neuester Zeit eingeführte «Thromboplastin-Generation-Test» (BIGGS³, DUCKERT⁴) weiteren Aufschluss bringen.

Das *Antihämophile Globulin* (AHG) = Faktor VIII ist ein sehr labiler Plasmaeiweisskörper, dessen Fehlen die als Hämophilie A⁵ bezeichnete hämorrhagische Diathese charakterisiert. Faktor VIII befindet sich neben Fibrinogen in der Fraktion I nach COHN. Bei der Gerinnung verschwindet das AHG praktisch vollständig, wird also im Serum nicht mehr gefunden. Da das AHG beim Lagern des Blutes inaktiviert wird, sind Blutkonserven für die Behandlung der Hämophilie-A-Kranken unbrauchbar.

Der von BIGGS und MACFARLANE beschriebene Christmas-Faktor⁶ = Faktor IX (wahrscheinlich identisch mit dem PTC = Plasma-Thromboplastin-Component⁷), dessen Fehlen die sogenannte Hämophilie B oder «Christmas disease» charakterisiert, ist viel stabiler. Man findet ihn nach der Gerinnung im Serum und auch im gelagerten Plasma. Die Hämophilie B kann somit mit Konservenblut behandelt werden.

Erst durch die Differenzierung der früher als Einheit angesehenen Hämophilie in *Hämophilie A* und *Hämophilie B* ist es möglich geworden, dem Hämophilen wirksamer zu helfen. Wir verstehen jetzt, warum in so vielen Hämophiliefällen die AHG-haltige Cohnsche Fraktion I vollkommen unwirksam war, warum andererseits Konservenblut, das AHG-frei ist, dennoch die Hämostase zu fördern vermochte.

Über *Faktor X* ist noch wenig bekannt. Nach KOLLER sinkt er im Verlauf der Cumarinbehandlung ab, er normalisiert sich beim Absetzen des Medikamentes etwas langsamer als Faktor VII und Prothrombin. Möglicherweise ist Faktor X identisch mit dem PTA-Faktor von ROSENTHAL.

BIGGS³ betrachtet das Reaktionsprodukt aus Plättchenfaktor 3 und den Faktoren VIII und IX und X als äquivalent dem Gewebsthromboplastin.

Das *Gewebsthromboplastin* ist nach den Untersuchungen von FEISSLY¹, von CHARGAFF² u.a. ein Lipoprotein. STUDER³ konnte in unseren Laboratorien zeigen, dass es sich durch Behandeln mit Äther in 2 inaktive Komponenten, eine Eiweiss- und eine Lipoidfraktion, aufspalten lässt, die zusammengefügt wieder volle Wirksamkeit zeigen. Auch beim Vereinigen der Lipoidfraktion mit Trypsinpräparaten beobachteten wir das Auftreten sehr stark thromboplastisch wirkender Substanzen. Zu beachten ist, dass die Thromboplastinpräparate der verschiedenen Tierarten gegenüber Blut der eigenen Gattung meist eine viel stärkere Aktivität aufweisen als gegenüber Blut anderer Tierarten. Wie wir an anderem Orte ausführlich darlegen werden, lässt sich die Artspezifität durch Einsatz von Faktor VII weitgehend aufheben. Siehe hierzu auch MANN und HURN⁴.

2. Phase: Bildung von Thrombin

Die inaktive Vorstufe des Thrombins, das *Prothrombin*, ist erst in den letzten Jahren, vor allem von SEEGERs und Mitarbeitern⁵, näher charakterisiert worden. Es stellt ein wasserlösliches schwefelhaltiges Glucoprotein dar, das sich in der COHNschen Globulinfraktion III-2 findet. Im Vergleich zu anderen Gerinnungsfaktoren erweist sich das Prothrombin als recht stabil, es verändert sich beim Lagern von Blut nur wenig. In gefrorenem Plasma hält es sich praktisch unbegrenzt. Mit verschiedenen Adsorptionsmitteln, wie Bariumsulfat, Calciumphosphat oder durch Seitzfiltration, kann es aus Plasma entfernt werden.

Für die *Prothrombinumwandlung* ist die Anwesenheit von *Calciumionen* nötig. Die Gerinnung kann durch Entfernung des Blutcalciums mit Amberlit oder durch calciumbindende Mittel, wie Natriumcitrat oder Natriumoxalat, verhindert werden.

Neben Thromboplastin und Calciumionen sind für die Umwandlung des Prothrombins in Thrombin noch die Faktoren V und VII erforderlich.

Die Existenz von *Faktor V*, häufig auch als *Proaccelerin* bezeichnet, wurde zuerst von NOLF⁶ (Thrombogen) angenommen und später von verschiedenen Forschern bewiesen (QUICK⁷ – labiler Faktor; OWREN⁸ – Faktor V bzw. Proaccelerin; WARE und SEEGERs⁹ – Ac-Globulin; FANTL und NANCE¹⁰ – Prothrombin-

¹ F. KOLLER, *Unser gegenwärtiges Wissen über die beschleunigenden Faktoren bei der Umwandlung des Prothrombins*, 4. Kongress der Europ. Hämatol. Ges. Amsterdam 1953, 8.–12. September.

² Faktor X (zehn) von KOLLER ist nicht zu verwechseln mit dem Albumin X (chi), dem sogenannten Heparin-Co-Faktor von QUICK.

³ R. BIGGS, *Versuche über die Aktivität von Thromboplastin*, 4. Kongr. Europ. Hämatol. Ges. Amsterdam 1953, 8.–12. September.

⁴ F. DUCKERT, M. MATTER und P. FLÜCKIGER, *Untersuchungen mit einer Modifikation des Thromboplastin-Generation-Tests*, 4. Kongr. Europ. Hämatol. Ges. Amsterdam 1953, 8.–12. Sept.

⁵ Zur Nomenklatur siehe: J. B. GRAHAM und K. M. BRINKHOUS, Brit. Med. J. 1953, 97.

⁶ Der erste von den Autoren untersuchte Patient hiess CHRISTMAS. – R. BIGGS, A. S. DOUGLAS, R. G. MACFARLANE u.a., Brit. Med. J. 1952, 1378.

⁷ I. SCHULMANN und C. H. SMITH, Blood 7, 794 (1952).

¹ R. FEISSLY, Helv. med. Acta 12, 215 (1945).

² E. CHARGAFF, A. BENDICH und S. S. COHEN, J. Biol. Chem. 156, 161 (1944).

³ A. STUDER, *Festschrift E. C. Barell*, Basel, 1946, S. 229.

⁴ F. D. MANN und M. H. HURN, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., N.Y. 79, 19 (1952).

⁵ W. H. SEEGERs, E. C. LOOMIS und J. M. VANDENBELT, Arch. Biochem. 6, 85 (1945).

⁶ P. NOLF, Arch. internat. Physiol. (Liège) 6, 1 (1908).

⁷ J. A. QUICK, Amer. J. Physiol. 140, 212 (1943).

⁸ P. OWREN, Acta Med. Scand. 194, 1 (1947).

⁹ A. G. WARE und W. H. SEEGERs, J. Biol. Chem. 172, 699 (1948).

¹⁰ P. FANTL und M. H. NANCE, Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci. 26, 207 (1948).

accelerator). Nach den Untersuchungen dieser Autoren stellt Faktor V ein in Wasser lösliches Globulin dar, dessen Aktivität schon bei Zimmertemperatur rasch abnimmt und das beim Erhitzen auf 56° in kurzer Zeit vollständig inaktiviert wird. Wir haben im Oxalatblut schon wenige Stunden nach der Blutentnahme eine Abnahme der Faktor-V-Aktivität feststellen können¹, die eine derartige Verlängerung der Thromboplastinzeit nach QUICK bewirkte, dass sie bei der Kontrolle der Cumarintherapie zu Fehlschlüssen geführt hätte.

Faktor-V-freies Plasma, das den gleichen Gerinnungsdefekt aufweist, wie er bei kongenitalem Faktor-V-Mangel (Owrensche Krankheit, Parahämophilie) beobachtet wird, erhält man in einfacher Weise durch mehrtägiges Lagern von menschlichem Oxalatplasma bei tiefer Temperatur. Im Gegensatz zu Prothrombin und Faktor VII wird Faktor V von Bariumsulfat usw. nicht adsorbiert.

Durch Spuren Thrombin wird Faktor V aktiviert, wobei er in den anscheinend noch labileren *Faktor VI* (Akzelerin) übergeht. Dieser lässt sich schon 30 min nach der Gerinnung in menschlichem Serum nicht mehr nachweisen.

Obwohl die Existenz von *Faktor VII* schon 1912 durch die Untersuchungen von BORDET und DELANGE² wahrscheinlich gemacht worden war, wurde er lange Zeit übersehen bzw. mit Prothrombin verwechselt. QUICK³ ist auch heute noch der Meinung, dass alle dem Faktor VII zugeschriebenen Eigenschaften besser durch die Annahme einer «inaktiven» Vorstufe des Prothrombins, von ihm *Prothrombinogen* genannt, erklärt werden können. Die QUICKsche Auffassung ist jedoch nicht mehr haltbar. Sie würde bedeuten, dass die Verkürzung der Thromboplastinzeit um 2–3 sek, wie man sie beim Stehenlassen von Zitratplasma beobachten kann, auf einer Umwandlung des Prothrombinogens in Prothrombin beruht. Demgegenüber konnten wir zeigen⁴, dass Zusatz von Prothrombin zu menschlichem Normalplasma keine Verkürzung der Thromboplastinzeit, Zusatz von Faktor VII oder von aktiviertem Faktor V jedoch eine solche um 3 sek bewirkt. *Bei der Lagerung von Zitratplasma tritt nach unseren Befunden keine Prothrombinvermehrung, sondern eine Aktivierung der Akzeleratoren auf.* Dass Faktor VII nicht etwa eine Vorstufe des Prothrombins darstellt, konnten wir auch mittels der Zweistufenmethode zur Prothrombinbestimmung nachweisen, wo Zusatz von Faktor VII zu menschlichem Normalplasma zwar eine Verkürzung der Umwandlungszeit, aber keine Vermehrung der Thrombinmenge bewirkt.

Die nähere Untersuchung von Faktor VII verdanken wir folgenden Autoren: OWEN und BOLLMANN⁵ – Pro-

thrombin-Conversion-Accelerator; OWREN¹ – Proconvertin; ALEXANDER *et al.*² – Serum-Prothrombin-Conversion-Accelerator-SPCA; JACOX³ – Serumaccelerator; MANN⁴ – Co-thromboplastin; KOLLER *et al.*⁵ – Faktor VII; STEFANINI⁶ – Stable Component.

Im Gegensatz zu Faktor V findet sich Faktor VII auch im gelagerten Serum, das eine vorzügliche Faktor-VII-Quelle darstellt. Bemerkenswerterweise ist die Faktor-VII-Aktivität im Serum meist höher als im Plasma. Man nimmt deshalb an (OWREN⁷, ALEXANDER und Mitarbeiter⁸), dass Faktor VII im Plasma in einer weniger aktiven Vorstufe, dem *Präfaktor VII*, vorliegt. Letzterer soll durch Einwirkung von Thrombin aktiviert werden (STEFANINI⁹). Faktor VII ist im Vergleich zu anderen Plasmafaktoren sehr stabil, er kann ohne wesentlichen Aktivitätsverlust während 30 min auf 50° erhitzt werden. Mit Bariumsulfat usw. wird er aus Serum oder Plasma entfernt.

In den Blutgerinnungsmechanismus greift Faktor VII in der Weise ein, dass er mit Thromboplastin in Gegenwart von Calciumionen einen aktivierten Thromboplastinkomplex (möglicherweise identisch mit dem *Convertin* von OWREN⁷) bildet, der dann zusammen mit Faktor VI die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin bewirkt. Nach FLYNN und COON¹⁰ lässt sich dieser Komplex isolieren.

Einblick in den Ablauf dieses Aktivierungsprozesses liefern unsere Untersuchungen¹¹ über die Beeinflussung der Thromboplastinzeit von menschlichem Normalplasma. Durch kurzes Stehenlassen von Faktor VII mit Gewebsthromboplastin und Chlorcalcium sowie durch Aktivieren von Faktor V mit Spuren von Thrombin bereiteten wir ein Gemisch der aktivierten Akzeleratoren, welches menschliches Normalplasma in 3½ sek zum Gerinnen brachte. Es handelte sich hierbei um die kürzeste bis jetzt beobachtete Thromboplastinzeit.

Der *autokatalytischen Bildung des Thrombins* kommt im Gerinnungsgeschehen eine hervorragende Bedeutung zu. Eine rasche und wirksame Hämostase ist nur möglich durch eine plötzliche Anhäufung von Thrombin an der Läsionsstelle. Diese Anhäufung tritt als Folge von einigen Kettenreaktionen ein, die durch

¹ P. A. OWREN, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 3, 168 (1951). Siehe hierzu auch: P. A. OWREN, *The Action of Dicumarol and Phenylindandione on Prothrombin, Proconvertin and Proaccelerin*, International Society of Hematology: 3. Internat. Congr., Cambridge 1950, S. 475 (Grune & Stratton, N.Y.).

² B. ALEXANDER, A. DE VRIES, R. GOLDSTEIN und G. LANDWEHR, Science 109, 545 (1949).

³ R. F. JACOX, J. Clin. Invest. 28, 492 (1949).

⁴ F. D. MANN, Amer. J. Clin. Path. 19, 861 (1949).

⁵ F. KOLLER, A. LÖLIGER und F. DUCKERT, Acta Haematol. 6, 1 (1951).

⁶ M. STEFANINI, Amer. J. Med. 14, 64 (1953).

⁷ P. A. OWREN, Rev. d'Hémat. 7, 147 (1952).

⁸ B. ALEXANDER, R. GOLDSTEIN, G. LANDWEHR und C. D. COOK, J. Clin. Invest. 30, 596 (1951). Siehe auch: R. BIGGS und R. G. MACFARLANE, Blackwell Scientific Publications (Oxford, 1953).

⁹ M. STEFANINI, Bull. New York Acad. Med. 30, 239 (1954).

¹⁰ J. E. FLYNN und R. W. COON, Fed. Proc. 12, 387 (1953).

¹¹ R. MARBET, R. STRÄSSLE und A. WINTERSTEIN, Helv. physiol. Acta 11, C65 (1953).

¹ R. MARBET und A. WINTERSTEIN, Helv. physiol. Acta 11, 81 (1953).

² J. BORDET und L. DELANGE, Ann. Inst. Pasteur 26, 655, 739 (1912).

³ A. J. QUICK, Lancet 264, 1307 (1953).

⁴ R. MARBET, R. STRÄSSLE und A. WINTERSTEIN, Helv. physiol. Acta 11, C65 (1953).

⁵ C. A. OWEN und J. L. BOLLMANN, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. N.Y. 67, 231 (1948).

Spuren von Thrombin ausgelöst werden. Näher studiert ist die durch Thrombin bewirkte Lysis der Plättchen (Zusatz von 50 Einheiten Thrombin zu 1 cm³ einer Plättchensuspension bewirkt einen Abfall der Plättchenzahl von 270 000 auf 7000 je mm³) sowie die Aktivierung von Faktor V zu Faktor VI; wahrscheinlich wird auch Präfaktor VII auf diesem Wege zu Faktor VII aktiviert (STEFANINI)¹.

Das bei der Umwandlung von Prothrombin entstehende *Thrombin* ist ein Albumin², welches beim Erhitzen auf 40–60° verhältnismässig rasch zerstört wird. SEEGER³ erhielt ein besonders reines Thrombinpräparat durch autokatalytische Umwandlung von Prothrombin mittels 25% Natriumcitrat.

Die Thrombinaktivität wird heute meist in NIH-Einheiten (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA.) angegeben. 1 NIH-Einheit entspricht derjenigen Menge Thrombin, welche 1 cm³ einer standardisierten Fibrinogenlösung in 15 sek bei 28° zum Gerinnen bringt. Der Begriff «standardisierte Fibrinogenlösung» ist nicht scharf umrissen, so dass exakte Einstellung auf NIH auch heute noch gewisse Schwierigkeiten bietet⁴.

3. Phase: Bildung von Fibrin

Bei der Umwandlung des *Fibrinogens* in Fibrin handelt es sich um einen fermentativen Prozess. 1 Teil Thrombin vermag 100 000 Teile Fibrinogen zur Gerinnung zu bringen. Calcium ist dabei nicht nötig, doch beschleunigt es die Reaktion. Fibrinogen ist ein Globulin (COHNSche Fraktion 1–2) mit einem Molekulargewicht von rund 400 000. Beim Erhitzen auf 50° koaguliert Fibrinogen. Auch bei Zimmertemperatur sind seine Lösungen nur begrenzt haltbar. Wir haben festgestellt, dass gealterte, scheinbar intakte Fibrinogenlösungen wesentlich mehr Thrombin zur Gerinnung benötigten als frisch bereitete Lösungen.

Der Mechanismus der Fibrinogen-Fibrin-Umwandlung ist noch nicht endgültig abgeklärt. LYONS⁵ nimmt an, dass die SH-Gruppen des Fibrinogens durch Thrombin zu S-S-Bindungen oxydiert werden, wodurch eine Art Polymerisation eintritt. Nach MORRISON⁶ handelt es sich bei der Fibrinogen → Fibrin-Umwandlung um eine molekulare Umgruppierung, wobei sich das Fibrin in einem dreidimensionalen Polymerisationsprozess bilden soll. LORAND⁷ glaubt, dass sich das Fibrin durch Abspaltung eines niedrig-

molekularen Peptides, des sogenannten Fibrinopeptides, aus dem Fibrinogen bildet. Eine Beurteilung der verschiedenen Auffassungen ist zur Zeit dadurch erschwert, dass es offenbar noch nicht gelungen ist, ganz reines, von antihämophilem Globulin freies Fibrinogen zu gewinnen. Die Anwesenheit von AHG könnte sich bei den Versuchen von LORAND ganz besonders störend auswirken.

Nachphase: Retraktion und Fibrinolyse

Lässt man Blut gerinnen, so bildet das entstandene Fibrin ein voluminöses Netzwerk, welches die gesamte Blutflüssigkeit in einen zusammenhängenden Kuchen verwandelt. Beim Stehen des Gerinnsels kontrahiert sich der Blutkuchen allmählich, wobei Serum ausgepresst wird. Dieser Vorgang wird als *Retraktion* bezeichnet. Sie dient physiologischerweise der Verfestigung des Gerinnsels. Das Temperaturoptimum für die Retraktion liegt bei 40°¹, sie wird stark gefördert durch die Blutplättchen (Retraktoenzym siehe oben). Thrombocytenfreies Plasma zeigte keine Retraktion. Die bei Thrombocytopathien und Thrombocytopenien verminderte Retraktion lässt sich quantitativ im Thrombelastographen nach HARTERT² messen und damit auch diagnostisch auswerten. Die Intensität der Retraktion wird auch durch die ursprünglich vorhandene Fibrinogenmenge, den Hämatokritwert sowie die Menge des während der Gerinnung vorhandenen Thrombins beeinflusst.

Die zweite Stufe in der Nachgerinnungsphase besteht in der Auflösung des retrahierten Fibrins durch Fibrinolyse. Da Fibrinolysin Gerinnungsfaktoren aus dem Gerinnungssystem eliminiert, betrachten wir diesen Vorgang zweckmässig gemeinsam mit den Inhibitoren der Gerinnung.

Inhibitoren der Blutgerinnung

Von den verschiedenen Inhibitoren der Blutgerinnung kommt dem Heparin und den Cumarinen therapeutisch für die Thrombosebehandlung eine ganz besondere Bedeutung zu. Für die Aufrechterhaltung des dynamischen Gleichgewichtes zwischen gerinnungsfördernden und gerinnungshemmenden Impulsen scheinen das Plasmaantithrombin, Antithromboplastin sowie Fibrinolysin eine besonders wichtige Rolle zu spielen.

*Heparin*³. Heparin wurde 1916 von McLEAN⁴ in der Leber entdeckt. Um die Aufklärung der Konstitution hat sich JORPES⁵ besonders verdient gemacht. Seinen

¹ M. STEFANINI, Bull. New York Acad. Med. 30, 239 (1954).

² T. ASTRUP und S. DARLING, Acta Physiol. Scand. 2, 22 (1941).

³ W. H. SEEGER, R. I. McCHANGHRY und J. L. FAHEY, Blood 6, 421 (1950).

⁴ R. BIGGS und R. G. MACFARLANE, Human Blood Coagulation, Blackwell Scientific Publications (Oxford 1953).

⁵ R. N. LYONS, Australian J. exp. Biol. Med. Sci. 23, 131 (1945).

⁶ P. R. MORRISON und C. L. SCUDDEN, Amer. J. Physiol. 170, 147 (1952). Siehe auch: J. D. FERRY und P. R. MORRISON, J. Amer. Chem. Soc. 69, 388 (1947).

⁷ K. LORAND, Biophysical and Biochemical Studies of the Clotting of Blood. Thesis for the degree of D. Ph. Leeds University, 1951.

¹ R. G. MACFARLANE, The Normal Haemostatic Mechanism and its Failure in the Haemorrhagic States, Thesis for the degree of doctor of medicine in the Univ. of London, 1938. Zitiert nach R. BIGGS und R. G. MACFARLANE, Human Blood Coagulation, Blackwell Scientific Publications (Oxford 1953).

² H. HARTERT, Dtsch. Arch. Klin. Med. 199, 402 (1952).

³ Zusammenfassende Darstellung siehe A. WINTERSTEIN, Héparine et héparinoïdes, Bull. Inst. nat. Genevois 1954, 111–126.

⁴ J. McLEAN, Amer. J. Physiol. 41, 250 (1916).

⁵ J. E. JORPES und S. BERGSTROM, J. Biol. Chem. 118, 447 (1937).

Untersuchungen sowie denjenigen von WOLFROM¹ gemäss stellt Heparin einen Mucoitinpolyschwefelsäureester dar, aufgebaut aus Glucosamin, Glucuronsäure und Schwefelsäure. Die Aminogruppe ist im Gegensatz zur nahe verwandten Chondroitinschwefelsäure nicht acetyliert, sondern sulfiert. Die Zuckerreste sind α -glucosidisch miteinander verknüpft (α -Heparin)². Das Molekulargewicht beträgt rund 12000. In den Abfällen der Heparinfabrikation fanden wir³ das sogenannte β -Heparin, welches als Aminosuckerkomponente Galactosamin enthält, acetyliert ist und β -glucosidische Bindungen aufweist. Aus Lebern und Lungen verschiedener Tierarten haben wir eine grössere Anzahl von Heparinen isoliert, die Aktivitäten zwischen 16 IE./mg und 280 IE./mg besitzen. Das internationale Standardpräparat des Heparins weist 130 IE. je mg auf.

Heparin als solches wirkt nicht gerinnungshemmend, erst in Vereinigung mit dem sogenannten *Co-Faktor* des Plasmas (Albumin X) gewinnt es seine Eigenschaften als polyvalentes Anticoagulans. Es hemmt sowohl die Umwandlung von Prothrombin in Thrombin als auch diejenige von Fibrinogen in Fibrin. Durch Einwirkung auf den Plättchenfaktor 3 verzögert es die Bildung des Blutthromboplastins. Die gerinnungshemmende Wirkung ist stark abhängig von der Plättchenzahl, offenbar wegen der heparinneutralisierenden Wirkung von Plättchenfaktor 3. Unsere Befunde⁴, wonach Heparin im gealterten menschlichen Citratplasma eine geringere gerinnungshemmende Wirkung entfaltet als in frischem, lassen sich durch einen Plättchenzerfall erklären, bei welchem die heparinneutralisierende Substanz ins Plasma abgegeben wird.

Die fördernde Wirkung des Heparins auf die Fibrinolyse kommt wahrscheinlich durch eine Auflockerung des Fibringerinnsels zustande.

Mit *Protamin* liefert Heparin eine schwerlösliche Verbindung, die keine gerinnungshemmende Aktivität aufweist.

*Cumarine*⁵. Die gerinnungshemmende Wirkung der Cumarine wurde 1941 von LINK und Mitarbeitern⁶ entdeckt, als sie nachweisen konnten, dass die als «sweet clover disease» beschriebene hämorrhagische Diathese des Rindes dem *Dicumarol* zuzuschreiben ist. Das *Dicumarol* war bereits 1903 von ANSCHÜTZ⁷ synthetisiert worden. In der Folge wurden weitere Präparate vom *Dicumarol*typus synthetisch dargestellt, welche für die Thrombosebehandlung bezüglich Wirk-

samkeit und Verträglichkeit besser geeignet schienen¹.

Im Gegensatz zu Heparin, welches nur die Reaktionsfähigkeit der Gerinnungsfaktoren herabsetzt, wirken die Cumarine durch Verminderung der Konzentration von Prothrombin und Faktor VII, eventuell auch von Faktor X. Diese Faktoren entstehen in der Leber unter der Mitwirkung von Vitamin K. Durch Verabreichung von Cumarinen wird Vitamin K aus einem Fermentkomplex verdrängt, wodurch die Produktion von Prothrombin und Faktor VII zum Stillstand kommt. Die Reaktion ist reversibel, das heisst, durch Zufuhr von Vitamin K₁ lässt sich das wirksame Vitamin K₁-Holoferment wieder restituieren.

Antithrombine. Nach SEEGERs und Mitarbeitern² enthält Plasma 4 Faktoren, die Thrombin inaktivieren:

1. *Antithrombin I* ist identisch mit Fibrin, das Thrombin durch Adsorption inaktiviert. Nach unseren Beobachtungen vermag Fibrin tatsächlich Thrombin zu fixieren, und zwar 2 NIH-Einheiten je mg.

2. *Antithrombin II* stellt den Plasma-Cofaktor dar, ohne den Heparin keine gerinnungshemmende Wirkung entfalten kann.

3. *Antithrombin III* inaktiviert Thrombin durch Bildung des sogenannten Metathrombins. Wir haben festgestellt, dass 1 cm³ Rinderplasma in 10 min über 3000 NIH-Thrombineinheiten zu inaktivieren vermag.

4. *Antithrombin IV* greift nach SEEGERs in die Prothrombinumwandlung ein.

Unter pathologischen Bedingungen können noch weitere Antithrombineffekte auftreten, zum Beispiel bei multiplem Myelom, Leberdysfunktion, Makroglobulinämien, Hyperglobulinämien. Hier kommt es zu Verschiebungen bei den Plasmaproteinen, insbesondere zur Globulinvermehrung. Wahrscheinlich werden Gerinnungsfaktoren durch Adsorption an Globuline inaktiviert³.

Antithromboplastin. Gemäss den Untersuchungen von LANCHANTIN und WARE⁴ enthalten Plasma und Serum auch einen *Thromboplastininhibitor*, welcher Gewebsthromboplastin bei Gegenwart von Calciumionen zu neutralisieren vermag. In einigen Versuchen konnten wir zeigen, dass 1 Teil Serum im Verlauf von 8 Stunden 1 Teil Thromboplastinlösung (Handelsform) zu inaktivieren vermag.

Nach TOCANTINS⁵ tritt unter pathologischen Bedingungen ein spezifischer Inhibitor des Plasmathromboplastins auf, welcher Lipoidnatur besitzt und die eigentliche Ursache der Hämophilie darstellen soll.

Fibrinolyse. Die Tatsache, dass sich intravasal geronnenes Blut wieder verflüssigen kann, führte

¹ M. L. WOLFROM, R. MONTGOMERY, J. V. LARABINOS und P. RATHGEB, J. Amer. Chem. Soc. 72, 5796 (1950).

² R. MARBET und A. WINTERSTEIN, Exper. 8, 41 (1952).

³ R. MARBET und A. WINTERSTEIN, Helv. chim. Acta 34, 2311 (1951).

⁴ R. MARBET und A. WINTERSTEIN, Praxis 42, 61 (1953).

⁵ Wir verstehen darunter alle Verbindungen, welche *Dicumarol*-wirkung besitzen.

⁶ M. A. STAHMANN, C. F. HUEBNER und K. P. LINK, J. Biol. Chem. 138, 513 (1941).

⁷ R. ANSCHÜTZ, Ber. dtsch. chem. Ges. 36, 463 (1903).

¹ Siehe hiezu: R. JÜRGENS, Schw. Med. Wschr. 83, 471 (1953).

² W. H. SEEGERs, J. F. JOHNSON und C. FELL, Amer. J. Physiol. 176, 97 (1954).

³ M. STEFANINI, Bull. New York Acad. Med. 30, 271 (1954).

⁴ G. F. LANCHANTIN und A. G. WARE, J. Clin. Invest. 32, 381 (1953).

⁵ L. M. TOCANTINS, Amer. J. Physiol. 39, 265 (1943).

NOLF¹ schon 1908 zur Vermutung, dass der Organismus über fibrinolytische Fermente verfüge. Dank den Untersuchungen verschiedener Forscher, wie ASTRUP², FERGUSON³ u.a., wissen wir heute, dass die fibrinolytische Wirkung des Blutes durch Umwandlung einer inaktiven Vorstufe = Profibrinolysin (Plasminogen, Prolysin) in ein wirksames Ferment = *Fibrinolysin* (Plasmin, Lysin) zustande kommt.

Die Aktivierung des Profibrinolysins erfolgt durch die *Fibrinolysokinase*. Unter normalen physiologischen Bedingungen ist die Fibrinolysokinase durch die *Anti-Fibrinolysokinase* in ihrer Wirkung gehemmt.

Die Wirkung des *Fibrinolysins* entspricht im wesentlichen derjenigen eines proteolytischen Fermentes. Es ist nicht spezifisch auf das Fibrin eingestellt, sondern vermag auch Fibrinogen zu zerstören. Es kann daher auch als *Fibrinogenolysin* angesprochen werden. Beim pathologischen Zustand der Afibrinogenämie, die durch das Vorhandensein grosser Mengen fibrinolytischen Fermentes gekennzeichnet ist, beobachtet man gelegentlich auch eine Verminderung der anderen Gerinnungsfaktoren⁴.

Die Wirkung des Fibrinolysins wird durch den entsprechenden Inhibitor, das *Antifibrinolysin*, neutralisiert. Für therapeutische Zwecke ist ein *Trypsin-Inhibitor* aus Sojabohnen vorgeschlagen worden. Nach

den Befunden von STEFANINI¹ sind ACTH und Cortison von grossem therapeutischem Wert bei der Bekämpfung fibrinolytischer Krisen. Letztere sind in neuester Zeit eingehender studiert worden. Sie treten vor allem nach vorzeitiger Placentaablösung², nach Eingriffen im Thoraxgebiet³ sowie bei Prostatacarcinom⁴ auf. Weiteres intensives Studium des gesamten Fibrinolyseproblems drängt sich auf, da uns zur Zeit noch sichere therapeutische Mittel fehlen, um die häufig tödlich verlaufenden Afibrinogenämien zu bekämpfen.

Summary

The most important facts and conceptions regarding the mechanism of blood coagulation, supplemented by our own as yet unpublished findings, are represented in a schematically simplified Table. The process of coagulation is subdivided into five phases, i.e. the pre-phase (vasoconstriction, agglutination), the first principal phase (formation of thromboplastin), the second principal phase (formation of thrombin), the third principal phase (formation of fibrin), as well as a post-phase (retraction, fibrinolysis). In this new scheme, recently discovered clotting factors and the various inhibitors could easily be incorporated into the classical picture of Morawitz. The scheme is explained briefly.

¹ M. STEFANINI und B. R. GENDEL, Clin. Res. Proc. 1, 5 (1953).

² O. KAESER, Revue d'Hématol. 7, 55 (1952).

³ O. D. RATNOFF, J. Clin. Invest. 31, 521 (1952).

⁴ H. J. TAGNON, W. F. WHITMORE und N. R. SHULMAN, Cancer 5, 9 (1952). Siehe auch: H. J. TAGNON, P. SCHULMAN u.a., J. clin. Invest. 31, 666 (1952).

¹ P. NOLF, Arch. Internat. de Physiol. 19, 395 (1908).

² T. ASTRUP, Acta Haematol. 7, 271 (1952).

³ J. H. LEWIS und J. H. FERGUSON, Revue d'Hématol. 7, 6 (1952).

⁴ N. R. SHULMAN, J. clin. Invest. 32, 604 (1953).

Sur les substances cardiotoniques de la scille maritime (*Scilla maritima* L.).

Par ARTHUR STOLL, Bâle¹

Introduction. De la longue série des recherches sur les glucosides cardiotoniques que nous avons commencées il y a plus de 30 ans, et qui ont porté depuis lors sur un assez grand nombre de plantes des genres de la scille², de la digitale³, du *Strophanthus*⁴, du *Periploca*⁵, de la *Coronilla*⁶, nous avons choisi comme sujet de cet exposé l'étude de la scille maritime. Et ceci pour différentes raisons. C'est à la base du problème que nous avons dû nous attaquer, puisqu'au début de nos recherches on ne savait même pas encore à quelle classe de substances la scille maritime devait son action sur le cœur. En effet, en ce qui concerne l'isolement et les formules de constitution des substances actives de cette drogue, nous sommes restés jusqu'à aujourd'hui pour ainsi dire seuls, fait certainement rare, car maintenant au contraire on reçoit souvent de l'aide d'autres laboratoires, dès qu'il s'agit de recherches promettant d'être intéressantes.

Au reste, les recherches sur les substances cardiotoniques de la scille maritime ont fourni des résultats qui n'ont pas de l'intérêt que pour cette seule plante, mais qui sont aussi importants dans une série de cas concernant l'isolement et la connaissance chimique d'autres substances cardiotoniques, comme nous le verrons au cours de cet exposé. Une autre raison de parler de la scille maritime est, que ces derniers temps on est parvenu à éliminer les incertitudes qui régnaient encore au sujet de la structure du principal glucoside de la scille maritime, le *scillarène A*, et en outre à élucider complètement la structure d'un autre glucoside de la même plante, le *scilliglaucoside*.

La scille maritime, *Scilla maritima* L. ou *Urginea maritima* BAKER, appartient aux liliacées et croît principalement dans les pays méditerranéens. Dans l'antiquité, on connaissait déjà les propriétés curatives de la scille. Les études historiques de SCHEER et SIGERIST⁷

font état du fait que les Egyptiens avaient érigé un temple en l'honneur de la scille. En Grèce, PYTHAGORE et plus tard THÉOPHRASTE, disciple d'ARISTOTE, attribuaient à cette plante des vertus thérapeutiques importantes: Elle favorisait la croissance et possédait des effets antiparasitaires et antiinfectieux. Dans l'antiquité, l'action diurétique de la scille était déjà connue et utilisée dans le traitement de la rétention urinaire.

Une des formules médicales les plus anciennes figurant sur un papyrus datant de 3500 ans, contient une prescription dans laquelle la scille est indiquée. La Figure 1 montre une coupure de ce papyrus avec la recette suivante:

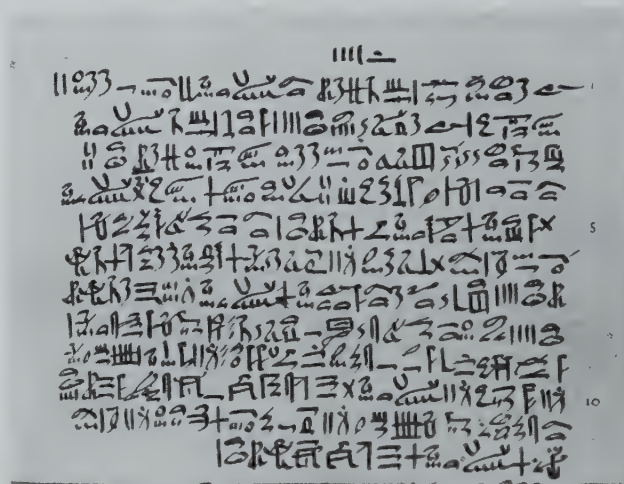


Fig. 1. Papyrus Ebers.

«Un autre remède pour «chasser» les maladies du cœur:

farine de dattes	$\frac{1}{4}$	bière douce	$\frac{1}{3}$
scille maritime	$\frac{1}{32}$	tehebu	$\frac{1}{2}$
amamu	$\frac{1}{3}$		

faire cuire, puis filtrer. A prendre pendant 4 jours.»

La plus ancienne image connue est un dessin très expressif de la scille maritime qui provient d'un manuscrit de DIOSCORIDE, du VI^e siècle (Fig. 2).

Plus près de nous, c'est VAN SWIETEN¹ en particulier qui au milieu du XVIII^e siècle a attiré l'attention sur l'importance de la scille dans le traitement de l'hydropisie dont on sait qu'elle résulte souvent d'une insuffi-

¹ D'après une conférence donnée à l'occasion de la séance commune des sections de Nancy, Strasbourg et Mulhouse de la Société chimique de France et de la Société chimique de Bâle, le 14 novembre 1953 à Bâle.

² Les publications sur les glucosides de la scille maritime seront citées plus loin en détail.

³ A. STOLL et W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 16, 1049, 1390 (1933); 17, 592 (1934); 18, 120 (1935); 35, 1318 (1952). — A. STOLL et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 35, 1310 (1952) — A. STOLL, A. VON WARTBURG et W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 35, 1324 (1952).

⁴ A. STOLL, J. RENZ et W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 20, 1484 (1937).

⁵ A. STOLL et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 22, 1193 (1939).

⁶ A. STOLL, A. PEREIRA et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 32, 293 (1949); 33, 1637 (1950).

⁷ H. SCHEER et E. SIGERIST, *Schweiz. med. Wschr.* 57, 1168 (1927).

¹ G. L. B. VAN SWIETEN, *Commentaria in Hermanni Boerhave Aphorismos de cognoscendis et curandis Morbis*, vol. 4 (1764).

sance cardiaque. VAN SWIETEN utilisait déjà la drogue fraîche qu'il avait trouvée spécialement active. Mais lorsque WILLIAM WITHERING¹, médecin écossais, introduisit en 1785 la digitale dans le traitement des maladies du cœur, la scille passa à l'arrière-plan, malgré la découverte de HOLMES² que la scille agissait aussi sur le cœur.

En dépit du fait que la scille figurait toujours depuis les plus anciennes notes dans les codes pharmaceutiques, sous forme, il est vrai, de préparations galéniques peu actives, il fallut attendre jusqu'en 1918 pour que l'attention se reporte sur elle. Un médecin allemand, MENDEL³, employait dans de nombreuses affections cardiaques une préparation de scille séchée, sans toutefois obtenir des résultats entièrement convaincants, car le séchage faisait perdre à la drogue une partie de ses substances actives. C'est ainsi que MARKWALDER⁴ put prouver que l'activité des préparations galéniques de scille pouvait varier de plusieurs fois cent pour-cent.

Il est évident que la préparation à l'état pur de principes actifs d'une drogue trouvant une application thérapeutique, élargit non seulement les connaissances scientifiques mais sert aussi à des buts pratiques. Seul un produit pur permet de préparer des médicaments de composition constante, assurant une action toujours égale et mettant à la disposition de la thérapeutique un remède indépendant des variations dues à la décomposition de bien des drogues. C'est en tenant compte de ce point de vue que nous avons commencé nos recherches sur les substances actives de la scille maritime⁵. Il n'y a pas de doute que les recherches entreprises jusque là pour préparer à l'état pur les substances actives de la scille avaient échoué, parce que ces substances en raison de leur instabilité avaient été déjà détruites au cours du séchage et des manipulations.

Isolement des glucosides de la scille maritime. Il faut insister tout spécialement sur l'importance qu'il y a d'utiliser des matières premières aussi fraîches que possible où les substances actives se trouvent à l'état natif. Le séchage, la fragmentation des drogues, l'extraction ou la purification ont été exécutés en prenant toutes les mesures de protection utiles. Les actions enzymatiques étaient éliminées afin d'empêcher la dégradation des substances actives.

Même si nous supposons que l'action de la scille sur le cœur était due, comme pour la digitale, à la présence de glucosides, il manquait cependant les belles et caractéristiques réactions colorées des glucosides de la digitale qui dépendent principalement de leur teneur

en digitoxose. Par la suite, nous fûmes donc obligés de continuer l'extraction et la purification des substances actives au moyen des tests de toxicité sur la grenouille, jusqu'à ce que nous ayons trouvé une réaction colorée caractéristique de la scille, soit la réaction de LIEBERMANN. Nous avons trouvé, en effet, que l'action des extraits de scille est proportionnelle à l'intensité de la coloration que les préparations de scille donnent avec l'anhydride acétique plus l'acide sulfurique concentré dans la réaction colorée de LIEBERMANN. C'est ainsi qu'un extrait de scille préalablement bien purifié donne d'abord une coloration rouge intense qui passe rapidement de bleu à vert-bleu.



Fig. 2. La plus ancienne image de la scille maritime.

La méthode finale qui a été mise au point pour préparer le glucoside principal de la scille maritime blanche, le *scillarène A*, consiste essentiellement dans les opérations suivantes: Les bulbes frais sont fragmentés, tout en les traitant par des sels qui précipitent les protéines, tel que le sulfate d'ammonium. Cela permet, d'une part, d'éliminer l'action des enzymes et, d'autre part, d'obtenir la coagulation des substances mucilagineuses. Dans la drogue, les glucosides se trouvent à l'état de tannoïdes et sont traités par l'ester acétique. Puis on fait agir de l'acétate de plomb pour éliminer les tannins, et l'on obtient ainsi un glucoside bien purifié. Si cette préparation est riche en scillarène A, il n'est alors pas difficile par une méthode de cristallisation appropriée de l'obtenir sous forme de très beaux cristaux purs. Dans une drogue de bonne qualité, le scillarène A constitue la majeure partie des glucosides totaux de la scille maritime blanche.

Après avoir laissé assez longtemps la préparation de scille en contact avec de l'ester acétique, mais sans addition de sel, nous avons obtenu une substance glucosidique cristallisant particulièrement bien et que nous avons prise, au début, pour du scillarène A. Mais l'hydrolyse montra qu'elle était plus pauvre en sucre.

¹ W. WITHERING, *An Account of the Foxglove and some of its Medical Use, etc.* (Birmingham 1785).

² E. M. HOLMES, *Pharmac. J. a. Transact.* 21, 233 (1890).

³ F. MENDEL, *Ther. Gegenw.* 1918, 16.

⁴ J. MARKWALDER, *Schweiz. med. Wschr.* 52, 560 (1922); *Klin. Wschr.* 1, 212 (1922).

⁵ A. STOLL, E. SUTER, W. KREIS, B. B. BUSSEMAKER et A. HOFMANN, *Helv. chim. Acta* 16, 703 (1933).

En laissant en contact le scillarène A avec la substance de la scille, une molécule de glucose se séparait du scillarène A, grâce à la présence d'un enzyme associé au glucoside dans la scille, et que nous avons nommé la scillarinase. C'est alors que la proscillaridine A, qui ne contient plus du glucose, prenait naissance.

Autrefois, on avait bien émis l'hypothèse que des enzymes de scission glucosidique pouvaient se trouver dans la drogue en même temps que les glucosides cardiotoniques¹; cependant, aucune preuve, soit analytique, soit de préparation, n'avait jamais été apportée en faveur de cette notion. Mais ce qui s'était produit maintenant pour la première fois, c'est la scission incontestable du scillarène A en proscillaridine A et en glucose par un enzyme spécifique. Il est prouvé que tous les glucosides cardiotoniques purs connus jusqu'en 1930 – à l'exception de l'ouabaïne et précisément du scillarène A – sont des produits artificiels provenant des glucosides natifs correspondants, par scission enzymatique d'une molécule de glucose, par exemple la digitoxine, la gitoxine, la digoxine, la k-strophanthine- β , etc. Dans ces dernières dizaines d'années, la dégradation successive des glucosides cardiotoniques rendue possible par les enzymes, a pris toujours plus d'importance aussi dans d'autres laboratoires. Elle permet, comme nous le verrons encore plus loin, de parvenir dans certains cas à des stades de dégradation impossibles à atteindre avec des méthodes chimiques. D'autre part, par une inhibition systématique de l'action enzymatique, on est arrivé à isoler toute une série de glucosides cardiotoniques natifs jusqu'ici inconnus et suivant leur intérêt de les introduire en thérapeutique.

Les eaux-mères du scillarène A contiennent le scillarène B qui est constitué par tout un mélange de glucosides également très actifs. Nous ne sommes

parvenus que récemment¹ à démembrer le scillarène B en différents glucosides homogènes à l'aide de colonnes de séparation constituées par du linters de coton ou de terre d'infusoires. Cette méthode nous a permis de préparer à partir du totum scillarène B huit nouveaux glucosides cristallisés à l'état de pureté et de les étudier au point de vue physique et chimique.

La scille rouge. Cette espèce constitue un domaine de recherche pour lui-même. Elle se différencie extérieurement de la scille blanche, dont la pulpe est blanche ou légèrement jaunâtre et seule l'enveloppe brune, par le fait que la pulpe de la scille rouge est d'une teinte rouge-brun intense et son enveloppe brun-rouge foncé. Entre les deux se trouvent les formes intermédiaires.

La scille rouge est extrêmement toxique pour les rats et autres rongeurs, aussi est-elle utilisée depuis longtemps comme produit de dératisation. Le rapport existant entre la coloration rouge du bulbe et l'action toxique faisait toujours penser que c'était la matière colorante elle-même qui était toxique. Mais c'était une erreur. Nous avons réussi à obtenir de la scille rouge et avec un bon rendement un glucoside pur et cristallisé, auquel nous avons donné le nom de scilliroside². Il possède une forte action sur le cœur, mais aussi une grande toxicité pour les rongeurs. D'après la méthode de KÄRBER, la dose létale moyenne du scilliroside pour le rat mâle est de 0,7 mg/kg, pour la femelle de 0,43 mg/kg. En revanche, ces animaux se montrent tout particulièrement résistants aux glucosides de la scille blanche, dont ils peuvent tolérer une dose 200 fois plus forte que celle du scilliroside.

Dans le Tableau N° I sont réunis tous les glucosides de la scille actuellement isolés à l'état pur ainsi que quelques données se rapportant à leurs propriétés physiques.

¹ Voir par exemple M. PERROT et A. GORIS, Bull. acad. Méd. (3^e S.) 62, 97 (1909).

¹ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 34, 1431 (1951).

² A. STOLL et J. RENZ, Helv. chim. Acta 25, 43 (1942).

Tableau I. Glucosides cardiotoniques de *Scilla maritima* L.

Glucoside	Formule brute	$[\alpha]_D^{20}$ dans le méthanol	Point de fusion (appareil de KOFLER ¹)
Proscillaridine A	$C_{30}H_{42}O_8$	– 83°	215–218°
Scillarène A	$C_{36}H_{52}O_{13}$	– 74°	230–240° ² 270–273° ³
Glucoscillarène A	$C_{42}H_{62}O_{18}$	– 66°	228–232°
Scilliphéoside	$C_{30}H_{42}O_9$ ⁴	– 74°	249–252°
Glucoscilliphéoside	$C_{36}H_{52}O_{14}$ ⁴	– 68°	269–270°
Scillicryptoside		– 48°	202–205°
Scilliglaucoside	$C_{30}H_{40}O_{10}$	+ 106°	164–166°
Scillicyanoside	$C_{32}H_{42}O_{12}$ ^{4,5}	+ 104°	221–222°
Scillicoeloside	$C_{30}H_{40}(42)O_{11}$ ⁴	+ 97°	165–167°
Scillazuroideside	$C_{30}H_{40}O_{11}$ ⁴	+ 131°	179–182°
Scilliroside ⁶	$C_{32}H_{44}O_{12}$	– 59,0–59,7°	168–170° décomposition à 200°

¹ Points de décomposition.

² Cristallisé dans l'alcool dilué.

³ Cristallisé dans l'alcool à 85%.

⁴ Formules provisoires.

⁵ Ce composé contient un acétyle.

⁶ De la variété rouge.

Figure 3 montre les cristallisations des glucosides cardiotoniques isolés de la scille blanche et indique les solvants dans lesquels elles ont été obtenues.

Comme nous l'avons déjà vu, le scillarène A constitue pour la plus grande partie, dans quelques drogues même les deux tiers, des glucosides totaux de la scille blanche. Le scilliroside domine dans la scille rouge, tandis que les neuf autres glucosides sont nettement moins abondants. Nous supposons que dans les eaux-mères il existe encore d'autres glucosides cardiotoniques qui n'ont pas été isolés jusqu'ici. Mais le Tableau N° I montre déjà que la scille, tout en tenant compte de certains éléments structurels dont nous parlerons plus loin, donne un si grand nombre de glucosides cardiotoniques comme il n'a jamais été possible d'en trouver dans aucune autre plante.

Les recherches chimiques des glucosides de la scille se sont faites dans deux domaines: Celui des aglucones et celui de la chaîne des sucres. Notre exposé tiendra compte de cette division naturelle, et nous commençons d'abord par les aglucones, puis nous passerons aux sucres.

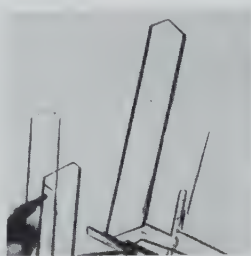
La structure des aglucones. WIELAND et WINDAUS, grâce à leurs études fondamentales sur les stéroïdes et les acides biliaires, ont posé les bases des recherches ultérieures sur les hormones sexuelles, cortico-surrénales, sur la vitamine D, de nombreuses saponines ainsi que des aglucones des glucosides cardiotoniques, qui tous appartiennent à la grande classe des stéroïdes.

Lorsqu'au début de 1930 on connut la formule du cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène comme squelette de base de ces dérivés, on avait fait de nets progrès dans la connaissance des aglucones des glucosides cardiotoniques. On avait, en effet, la possibilité de transformer par dégradation les glucosides cardiotoniques en des dérivés déjà connus et de faire des déductions sur leur structure. Par exemple, on put alors déterminer la place de groupes fonctionnels spécifiques dans le squelette du cyclo-pentano-perhydro-phénanthrène.

Sous ce rapport, les glucosides de la scille ou leurs aglucones ont fourni d'intéressants exemples, et l'on a découvert des relations étroites entre les stéroïdes du règne végétal et du règne animal. En voici quelques



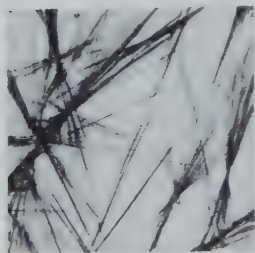
Proscillaridine A
(alcool méthylique)



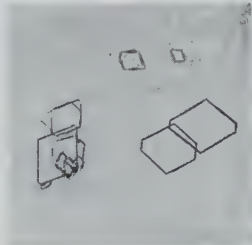
Scillarène A
(alcool méthylique 50%)



Glucoscillarène A
(alcool méthylique)



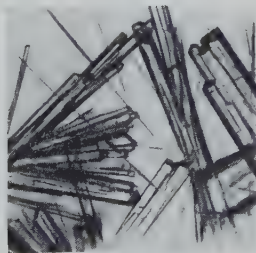
Scilliphéoside
(acétone)



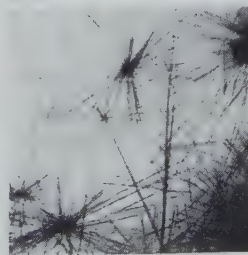
Glucoscilliphéoside
(alcool méthylique-eau)



Scilliglaucoside
(alcool méthylique)



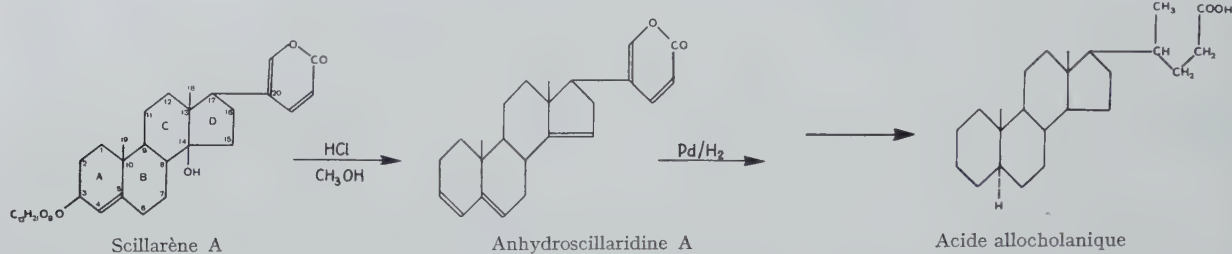
Scillicyanoside
(alcool méthylique)



Scillicoeloside
(alcool méthylique)

Fig. 3.

exemples qui, en même temps, ont permis d'éclaircir la constitution des aglucones de quelques glucosides de la scille. Nous parlerons d'abord de la transformation du scillarène A en acide allocholanique¹. La manière de formuler la constitution s'éloigne du développement historique en ce sens, que la formule valable et utilisée aujourd'hui diffère de celle autrefois hypothétique par la position de libération du noyau.



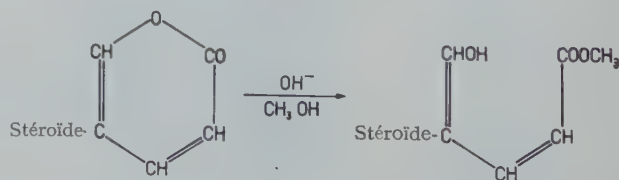
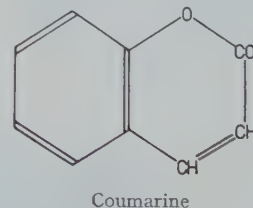
A l'aide d'acide chlorhydrique dans du méthanol on sépare le groupe des sucres du scillarène A, placé en position 3. Par élimination des groupes hydroxyles en position 3 et 14, sous forme de deux molécules d'eau, deux nouvelles doubles liaisons se forment entre 3 et 4 et 14 et 15, et en même temps la double liaison initiale 4-5 se déplace en 5-6 sous formation d'anhydro-scillaridine A. Si l'on soumet cette dernière à une réduction catalytique par l'hydrogène, toutes les doubles liaisons de la molécule, c'est-à-dire les trois doubles liaisons du noyau et les deux doubles liaisons du cycle lactonique hexagonal sont saturées par l'hydrogène. En majeure partie le cycle lactonique est ouvert par réduction, si bien qu'il y a formation d'un acide carboxylique complètement saturé avec une chaîne latérale ouverte. Heureusement que cet acide carboxylique s'est révélé être identique à l'acide allocholanique, que l'on obtient de l'acide hyo-désoxy-cholique de la bile de porc par les méthodes de WINDAUS² et de WIELAND³. On fut alors à même de tirer les conclusions directes sur la structure de l'aglucone du scillarène A, en se basant sur la formule et la constitution déjà connues de l'acide allocholanique, et on était d'autant plus autorisé à le faire, que dans les séries de réactions décrites chaque changement plus important de la molécule, en particulier toute modification dans le noyau carbonique, était soigneusement évité. On a donc été à même de prouver de la manière la plus simple l'étroite parenté entre deux classes de corps, d'une part les aglucones des glucosides cardiotoniques et d'autre part les acides biliaires.

Il ressort des considérations suivantes que le cycle lactonique hexagonal est caractérisé par deux doubles liaisons. Contrairement aux aglucones des glucosides

digitaliques et strophanthiques possédant 23 atomes de carbone, la scillaridine A en a 24. En identifiant le produit obtenu à partir de l'anhydro-scillaridine A, lors de la réduction totale par scission réductrice du cycle lactonique avec l'acide allo-cholanique, dont la chaîne latérale possède cinq atomes de carbone, il résulte forcément que le cycle lactonique ne peut être qu'hexagonal. Par détermination précise de son

poids moléculaire¹ nous avons par ailleurs établi que la scillaridine A, comme l'acide allocholanique, est caractérisée par 24 atomes de carbone, ce qui, jusqu'ici, n'était pas absolument certain. Lors de l'hydrogénation catalytique six molécules d'hydrogène sont utilisées, dont trois pour la saturation des trois doubles liaisons du noyau, deux pour les deux doubles liaisons du cycle lactonique et une pour ouvrir le cycle.

On ignorait jusqu'ici l'existence d'un cycle hexagonal avec deux doubles liaisons dans les stéroïdes. Avant que nous l'ayons établi pour le scillarène A, nous l'avons donc recherché dans des exemples analogues dont l'un nous fut donné dans la coumarine qui, lors de la scission par des alcalis dans le méthanol, se comporte exactement comme le scillarène A². Le cycle lactonique est scindé, et le groupe carboxyle qui se forme est estérifié. Mais cet ester est encore fortement acide, on peut le titrer et il donne des dérivés acylés. On doit, par conséquent, le considérer comme un émol, ce qui est en accord aussi avec d'autres transformations, par exemple la formation d'un éther avec le diazo-méthane ou la formation d'un sel de potassium. C'est pourquoi il faut formuler le cycle lactonique des



¹ A. STOLL, A. HOFMANN et W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 17, 1334 (1934). — A. STOLL, A. HOFMANN et A. HELFENSTEIN, *Helv. chim. Acta* 18, 644 (1935).

² A. WINDAUS et A. BOHNE, *Ann. Chem.* 433, 278 (1923).

³ H. WIELAND, E. DANE, C. MARTIUS, W. GUMMICH et G. HESSE, *Z. physiol. Chem.* 215, 15 (1933).

¹ A. STOLL, A. HOFMANN et J. PEYER, *Helv. chim. Acta* 18, 1247 (1935).

² A. STOLL et A. HOFMANN, *Helv. chim. Acta* 18, 82 (1935).

glucosides de la scille de manière analogue à la coumarine, ceci toutefois à l'état libre, en liaison avec le squelette stéroïde à l'atome de carbone 17.

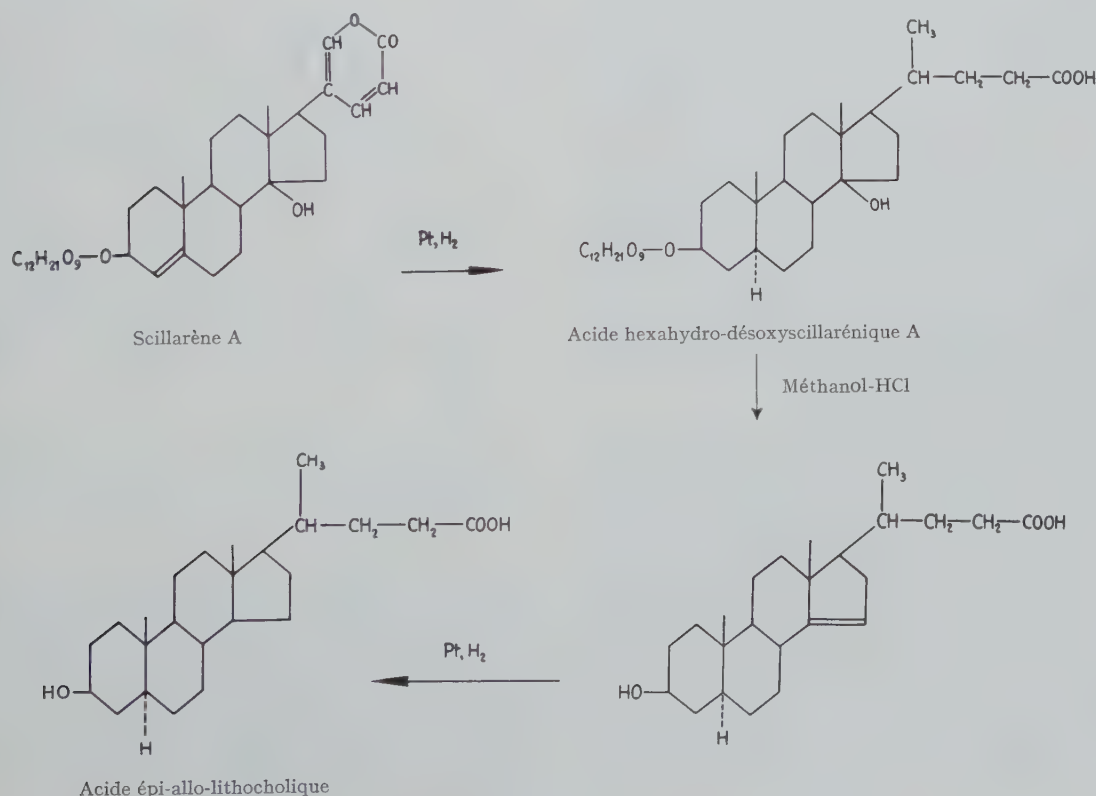
Cette même formule, à savoir le cycle lactonique hexagonal doublement non saturé, a été admise une année plus tard par WIELAND et ses collaborateurs¹ et TSCHESCHE et OFFE² pour les venins de crapauds. Comme dans les glucosides de la scille et les venins de crapauds, il semble être responsable de l'action cardiaque. Si l'on procède à sa scission, l'effet cardiaque est entièrement supprimé. La réduction des doubles liaisons a pour conséquence la diminution de l'effet cardiaque à un pourcentage minime. Le cycle lactonique hexagonal avec deux doubles liaisons n'existe pas seulement dans les glucosides cardiotoniques de la scille, mais il a été prouvé depuis aussi dans l'hellébrine, isolée par W. KARRER³, la désglucohellébrine, préparée par SCHMUTZ⁴, la rubelline et la transvaaline, toutes les deux isolées par LOUW⁵, et dans les glucosides des bulbes de *Bowiea volubilis*, isolés et étudiés par KATZ⁶ et par TSCHESCHE⁷. Tous les glucosides de la

scille rouge et de la scille blanche connus à ce jour possèdent ce cycle hexagonal.

Dans la formule de constitution du scillarène A déterminée en transformant l'anhydro-scillaridine A en acide allocholanique, les positions de l'hydroxyle qui porte le sucre et de la double liaison voisine étaient encore incertaines. La recherche de la position de l'hydroxyle fut plus difficile, parce que le scillarène A, lors de son hydrolyse, perd en même temps l'hydroxyle qui en est porteur sous formation d'une nouvelle double liaison. La position de la chaîne des sucres, du scillabiose, constitué par du rhamnose et du glucose, a été d'abord admise en position 5. Mais par la méthode suivante on est parvenu à établir que le sucre est lié à un hydroxyle en C3¹.

Lors de l'hydrogénation du glucoside non saponifié, le scillarène A lui-même, se forment par saturation de trois doubles liaisons (deux dans le cycle lactonique, une dans le noyau), l'un à côté de l'autre un acide monobasique, l'acide hexahydro-déoxyscillarénique A et une lactone neutre, l'hexahydro-scillarène A qui ne nous intéresse pas ici. Le traitement de l'acide par de l'acide chlorhydrique dans l'alcool absolu réalise l'élimination du sucre, où cependant l'hydroxyle qui le porte est conservé, parce que l'influence de la double liaison voisine est supprimée par son hydrogénation. C'est uniquement l'élimination de l'hydroxyle tertiaire en C14 qui aboutit à une double liaison. Si cet acide est hydrogéné à fond par réduction catalytique au platine,

¹ A. STOLL et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 24, 1380 (1941).



il se forme alors un mélange d'acides stéréo-isomères, desquels on a pu isoler l'acide épi-allo-litho-cholique (acide 3- β -oxy-allocholannique). Nous avons préparé l'ester méthylique de l'acide obtenu à partir du scillarène A et son acétate et avons pu déterminer l'identité avec les dérivés correspondants, réalisés à partir de l'acide hyo-désoxy-cholique d'après le procédé de WIELAND¹.

Grâce à l'identité des deux acides 3- β -oxy-allocholanniques et leur différenciation du reste des autres acides litho-choliques stéréo-isomères, on a pu, pour le scillarène A, déterminer en même temps la configuration *cis* de l'hydroxyle en C3 porteur des sucres par rapport au groupe méthyle en C10. Nous reviendrons plus loin sur ce point.

Jusqu'à ces derniers temps, dans le scillarène A, la position de la double liaison voisine de l'hydroxyle en C3 était encore indéterminée. Ainsi que nous l'avons déjà vu, l'hydroxyle porteur des sucres en position 3 avait été éliminé du noyau par hydrolyse acide avec élimination d'eau et formation d'une nouvelle double liaison. La scillarénase et les autres enzymes glucosidatiques séparaient bien le glucose terminal du scillarène A, mais n'attaquaient pas la liaison entre l'aglucone et le rhamnose. Toutefois, nous sommes parvenus finalement par des procédés enzymatiques à scinder cette liaison, tout en conservant l'hydroxyle en C3², grâce au fait que par culture et repiquage sur milieu de culture contenant du rhamnose au lieu de glucose, nous avons réussi à obtenir une souche de *penicillium* accoutumée au rhamnose comme unique source de carbone, et l'avions obligée à former un système enzymatique adapté. Cet enzyme élimina de la proscillaridine A le reste de rhamnose, en conservant le groupe hydroxyle en C3, et forma facilement l'aglucone primaire, auquel nous avons donné le nom de *scillarénine*.

Ainsi que nous nous y attendions, son spectre ultra-violet est pratiquement identique à celui du scillarène A (voir Fig. 4 et 5). Seul le maximum caractéristique pour le cycle lactonique se manifeste à 300 m μ et $\log \epsilon = 3,72$. Pour la scillaridine A, par contre, on observe encore un autre maximum à 230 m μ et le $\log \epsilon = 4,23$ qui est caractéristique de deux doubles liaisons conjuguées distribuées sur deux noyaux.

Par oxydation de la scillarénine avec de l'acide chromique ou du butylate tertiaire d'aluminium, d'après la méthode d'OPPENAUER, on obtient la cétone en position 3, le scillarénone, qui possède deux maxima d'absorption dans l'ultra-violet, l'un à 300 m μ et l'autre à 240 m μ et le $\log \epsilon = 4,25$. Le premier maximum correspond au cycle lactonique hexagonal à deux doubles liaisons, le second se rapporte à un groupe-

ment cétonique non saturé en α - β , c'est-à-dire que la double liaison du scillarénone se situe immédiatement à côté du groupe cétonique entre les positions 4 et 5. Mais il restait à prouver si c'était également le cas dans la scillarénine et le scillarène A lui-même; car au cours de l'oxydation, cette double liaison pourrait se déplacer du cycle B dans le cycle A.

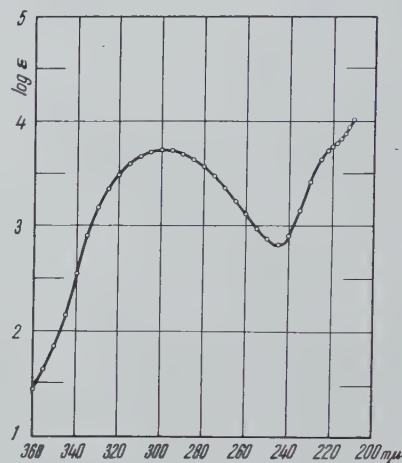


Fig. 4. Spectre ultra-violet du Scillarène A.

C'est pourquoi nous avons eu recours à un artifice et avons de nouveau utilisé un enzyme fongique, qui non seulement scinde le radical glucidique du scillarène A

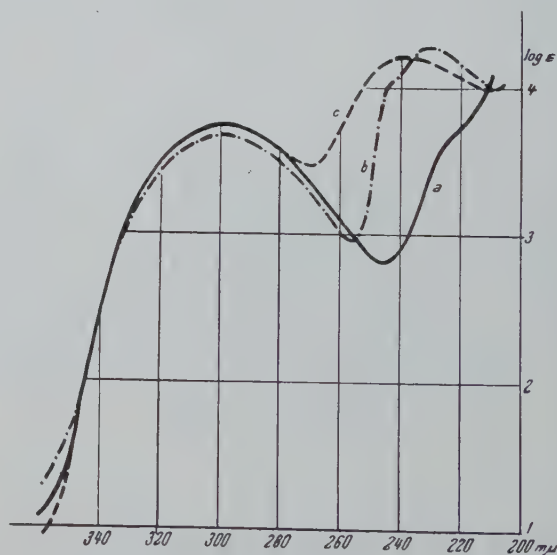


Fig. 5. Spectres ultra-violet. Scillarénine (a), Scillaridine A (b) et Scillarénone (c) dans l'alcool absolu.

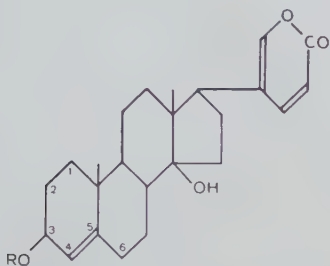
ou de la proscillaridine A et dégage le groupe hydroxyle en C3, mais oxyde en même temps ce groupe et le transforme en groupe cétonique¹. De telles oxydations du squelette des stéroïdes ont été effectuées ces derniers temps, et en effet, nous avons obtenu la cétone

¹ H. WIELAND, E. DANE, C. MARTIUS, W. GÜMLICH et G. HESSE, Z. physiol. Chem. 215, 15 (1933).

² A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, Helv. chim. Acta 34, 2301 (1951).

¹ A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, Helv. chim. Acta 35, 1934 (1952).

scillarénone par voie enzymatique, en quantité appréciable. Le produit était identique à la cétone obtenue par oxydation à partir de la scillarénine. Si on réussissait alors à transformer le scillarénone par réduction en scillarénine, en tenant compte de la possibilité de la formation d'isomères cis, trans, on prouvait ainsi le voisinage immédiat de la double liaison et du groupe hydroxyle en C3; la double liaison devait alors se trouver en position 4-5. Ceci fut confirmé par la réduction du scillarénone par l'isopropylate d'aluminium d'après MEERWEIN-PONNDORF, qui en effet fournit surtout un produit en tout point identique à la scillarénine d'origine naturelle.



R = H: Scillarénine R = Rhamnose: Proscillaridine A
R = Rhamnose-Glucose (= Scillabiose): Scillarène A
R = Rhamnose-Glucose-Glucose (= Scillatriose): Glucoscillarène A

La scillarénine ne pouvant pas être précipitée par la digitonine, bien que le groupe hydroxyle en C3 soit en position β , la séparation du scillarénone ne put être effectuée par l'intermédiaire du digitonide. Mais la chromatographie sur oxyde d'aluminium permit de séparer une fois de la cétone non modifiée et, enfin, une préparation de scillarénine identique à la scillarénine obtenue par dégradation enzymatique à partir de la proscillaridine A. Ainsi il est prouvé que la double liaison du noyau est en position Δ^4 , et nous sommes en mesure de formuler la constitution du glucoside principal de la scille maritime, le scillarène A, dans tous ses détails et dans la disposition spatiale de ses substituants.

Cet exemple montre que les recherches de structure et de configuration exigent souvent un travail de plusieurs années et le développement de nouvelles méthodes pour élucider les derniers points douteux de

la constitution d'une substance naturelle. Il est intéressant de noter que le scillarénone a aussi une forte action sur le cœur, qui n'est guère moins forte que celle du glucoside scillarène A. Le tableau suivant montre les glucosides dérivant de la scillarénine, l'aglucone initial, et qui ont été découverts dans la scille maritime.

Récemment, REICHSTEIN¹ et ses collaborateurs sont parvenus à constater que la transvaaline, extraite de l'*Urginea rubella*, est identique au scillarène A.

Les recherches² destinées à éclaircir la constitution du raticide, le scilliroside, sont bien plus compliquées que celles qui viennent justement d'être décrites pour fixer la structure du scillarène A. Elles ne sont pas encore terminées. Toutefois, la formule suivante que nous comparons à celle du scillarène A, montre l'analogie existante entre les deux glucosides, ainsi que des différences paraissant insignifiantes mais qui, en définitive, conditionnent leur action différente.

Par analogie et d'après les résultats de nombreuses recherches, nous pouvons considérer que les points suivants sont acquis:

- 1° Un groupe hydroxyle, porteur dans le glucoside d'une molécule de glucose, est fixé en C3;
- 2° Un hydroxyle tertiaire est fixé en C14;
- 3° Un cycle lactonique hexagonal, porteur de deux doubles liaisons, est fixé en C17.

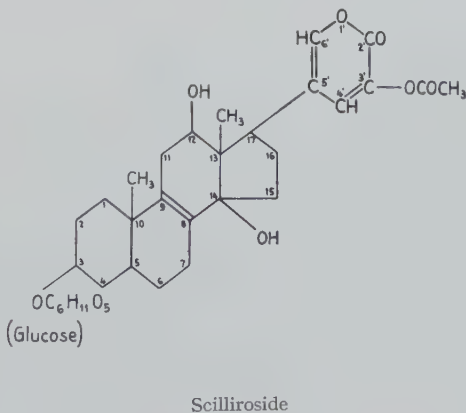
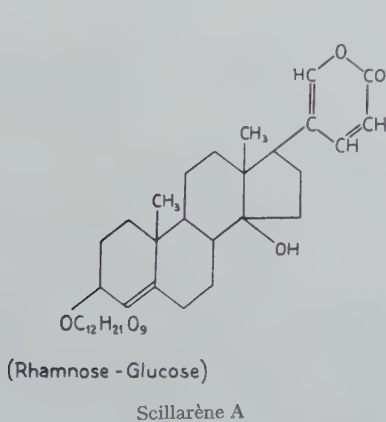
Il n'est pas certain, mais probable, que:

- 1° Une double liaison, difficile à hydrogéner, se trouve dans le noyau, entre C8 et C9;
- 2° Un hydroxyle est rattaché à C12;
- 3° Un groupe acétoxy, qui est très probablement responsable de l'activité raticide, est fixé au cycle lactonique en position α par rapport au groupe carbonyle.

Actuellement, nous cherchons encore à éliminer les points douteux de la formule que nous avons indiquée pour le scilliroside.

Nous traitons ici plus en détail la structure d'un glucoside de la scille, qui a été complètement élucidée

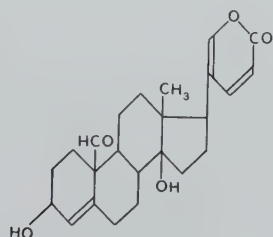
¹ P. ZOLLER et CH. TAMM, *Helv. chim. Acta* 36, 1744 (1953).
² A. STOLL et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 25, 377 (1942). - A. STOLL, J. RENZ et A. HELFENSTEIN, *Helv. chim. Acta* 26, 648 (1943).



ces tout derniers temps. Nous avons déjà mentionné plus haut le procédé fastidieux de fractionnement du mélange très compliqué des glucosides secondaires de la scille maritime¹ qui nous avait fourni le précieux produit de départ, le scilliglaucoside.

Nous nous contentons de la démonstration suivante basée sur un choix de réactions et d'observations particulièrement concluantes, empruntées à un travail qui a été publié ailleurs².

Bien que le scilliglaucoside ne contienne comme sucre qu'une molécule de glucose, aucun enzyme n'a pu scinder l'aglucone et le sucre. Un acide opère facilement cette hydrolyse, mais le produit de réaction n'est pas homogène. Suivant les conditions dans lesquelles l'essai est réalisé, on obtient l'aglucone primaire, la scilliglaucosidine, en quantités variables, ainsi que différents produits secondaires amorphes ou cristallisés, un d'eux correspondant à l'anhydro-scilliglaucosidine³. Pour la scilliglaucosidine, nous avons pu établir la formule de structure suivante⁴:



Scilliglaucosidine

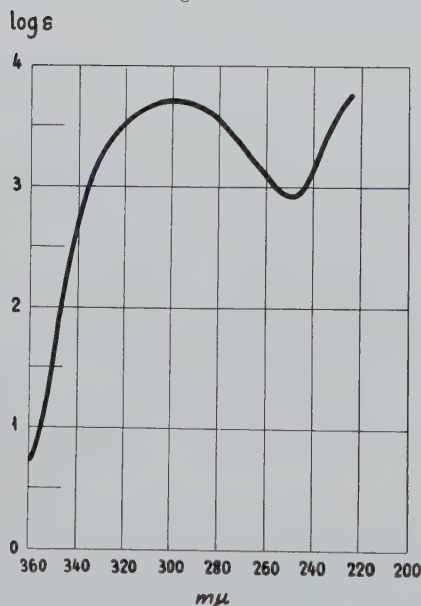


Fig. 6. Spectre ultra-violet de la scilliglaucosidine.

La formule brute montre déjà que l'aglucone du scilliglaucoside, la scilliglaucosidine, possède cinq

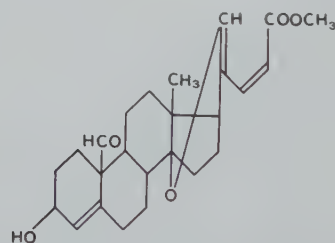
¹ A. STOLL et W. KREIS, *Helv. chim. Acta* **34**, 1431 (1951).

² A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* **36**, 1531 (1953).

³ A. STOLL, W. KREIS et A. VON WARTBURG, *Helv. chim. Acta* **35**, 2495 (1952).

⁴ A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* **36**, 1531 (1953).

atomes d'oxygène. Deux font partie du cycle lactonique hexagonal, porteur de deux doubles liaisons, qui est caractérisé dans le spectre ultra-violet par un maximum vers 300 mμ. Ce maximum est typique pour le scillarène A et ses dérivés, comme nous l'avons vu précédemment. La scilliglaucosidine contient encore un groupement hydroxyle qui peut être acylé. Comme le scilliglaucoside lui-même ne contient que quatre groupes hydroxyles acylables, ils font tous partie du reste de sucre. C'est l'hydrolyse qui a dû libérer ce groupe hydroxyle acylable de l'aglucone. Ce groupe est donc bloqué par le sucre dans le glucoside. Il est fixé en C3 comme dans tous les aglucones des produits cardio-actifs examinés jusqu'à présent. D'après le pouvoir rotatoire de la scilliglaucosidine et de plusieurs de ses dérivés et d'après l'effet cardiaque intense du scilliglaucoside, il faut admettre que cet hydroxyle en C3 possède la configuration β. Un autre atome d'oxygène est fixé sous forme d'hydroxyle tertiaire, comme le montre déjà la détermination de l'hydrogène actif par la méthode de ZEREWITINOFF. La scilliglaucosidine réagit en présence de potasse caustique méthanolique d'une façon analogue au scillarène A et à la scillaridine A. Ceci revient à dire que le cycle lactonique est saponifié et que le groupe carboxyle ainsi libéré est esterifié. L'acidification du produit de réaction a pour effet de former, par un pont d'oxygène, un nouveau cycle entre le groupe hydroxyle tertiaire et l'hydroxyle énolique du cycle lactonique avec formation d'ester méthylique de l'acide isoscilliglaucosidinique (voir formule suivante).

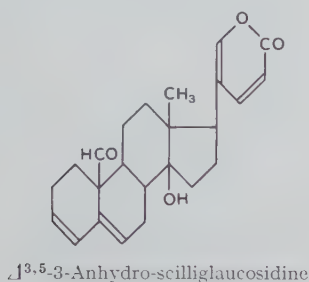


Ester méthylique de l'acide isoscilliglaucosidinique.

Cette réaction permet d'abord d'élucider la structure et la position de l'anneau lactonique et de constater encore que l'hydroxyle tertiaire est fixé en C14 et que ces deux substituants enfin possèdent la même configuration spatiale. Le 5^e oxygène doit appartenir à un groupe carbonyle, puisque le glucoside acétylé ainsi que son aglucone réagissent avec l'hydroxylamine avec formation des oximes correspondants. Comme l'acétyl-scilliglaucosidine aussi bien que le tétraacétyl-scilliglaucoside sont transformés en acide au cours de l'oxydation par l'acide chromique et que le cycle lactonique est conservé, le groupe carbonyle doit être un aldéhyde. Par analogie avec la strophanthidine, l'hellébrigénine et la corotoxigénine, il doit être fixé en C10. Cet aldéhyde est réduit par la méthode de MEERWEIN-PONNDORF en alcool primaire. Déjà les réactions

que nous venons de décrire permettent de déterminer les fonctions de ces cinq atomes d'oxygène qui se présentent sous forme de deux groupes hydroxyles, un groupe aldéhydique et un cycle lactonique.

L'hydrogénation catalytique de la scilliglaucosidine a prouvé que cette substance possède, en plus des deux doubles liaisons de son cycle lactonique, encore une autre double liaison. Les recherches suivantes ont montré que cette double liaison est située entre C4 et C5 comme dans la scillarénine. Par hydrolyse du scilliglaucoside, il se forme, à côté d'un aglucone intact et ainsi que nous l'avons signalé, un composé monoanhydre qui contient encore un atome d'hydrogène actif, mais plus aucun groupe hydroxyle pouvant être acylé, comme le montre la formule suivante.



Il ressort du spectre dans l'ultra-violet de ce composé (Fig. 7) que le groupe hydroxyle en C3 a été éliminé avec formation d'un système diène. Le maximum, qui se trouve à $227\text{ m}\mu$, est caractéristique pour les $\Delta^{3,5}$ stéroïdes; il parle en faveur de la présence de deux doubles liaisons dans deux cycles voisins. Si la double liaison du noyau de la scilliglaucosidine est située entre C5 et C6 comme dans la cholestérine, ou entre C5 et C4 comme dans la scillarénine, l'oxydation de l'hydroxyle fixé en C3 devrait donner une cétone α - β non saturée. Celle-ci se caractérise par un maximum à $242\text{ m}\mu$ du spectre ultra-violet.

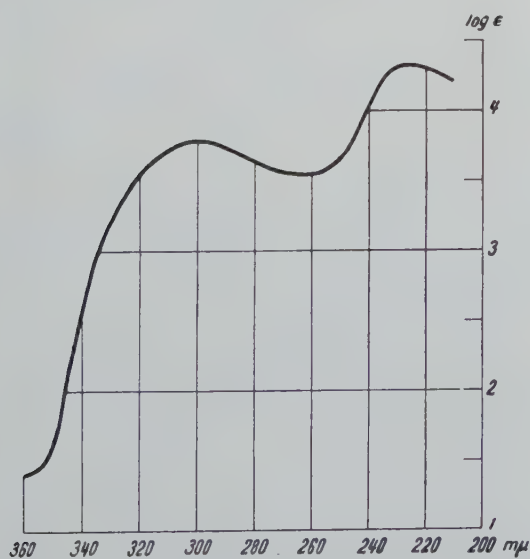
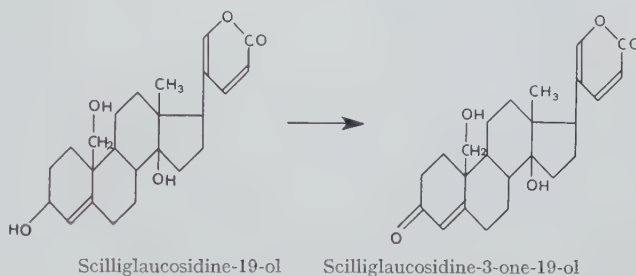


Fig. 7. Spectre ultra-violet de la $\Delta^{13,5}$ -3-anhydro-scilliglaucosidine dans l'alcool.

Pour empêcher des réactions secondaires indésirables du groupe aldéhyde, nous avons oxydé partiellement dans une solution de toluène le scilliglaucosidine-19-ol (formule) en scilliglaucosidine-3-one-19-ol (formule) avec de l'isopropylate d'aluminium et de la cyclohexanone, sans protection préalable du groupe alcool primaire.



Le spectre dans l'ultra-violet montre nettement, à côté du maximum dû au cycle lactonique se trouvant à $300\text{ m}\mu$, celui dû au groupement cétonique non saturé en α - β à $242\text{ m}\mu$ (Fig. 8).

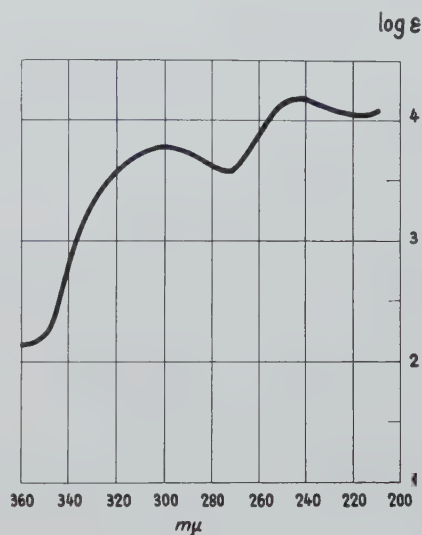


Fig. 8. Spectre ultra-violet de la scilliglaucosidine-3-one-19-ol.

Si l'on calcule les différences du pouvoir rotatoire moléculaire qui apparaissent au passage des 3-oxy- aux 3-cétostéroïdes et que l'on compare les valeurs obtenues pour les stéroïdes Δ^4 et Δ^5 avec celles des dérivés correspondants de la scilliglaucosidine, il apparaît que la double liaison de la scilliglaucosidine doit être placée entre C4 et C5, c'est-à-dire comme dans la scillarénine (Tableau II).

Il existe cependant certaines différences entre la scillarénine et la scilliglaucosidine. C'est ainsi que la réaction de ROSENHEIM avec l'acide trichloracétique, qui est positive pour le scillarène A et la scillarénine, est négative dans les mêmes conditions d'expérience pour la scilliglaucosidine.

A part cela, le groupe hydroxyle de la scilliglaucosidine en C3 s'élimine beaucoup plus difficilement que

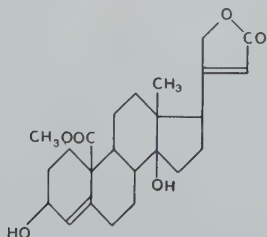
Tableau II. Différences du pouvoir rotatoire moléculaire dues au passage des alcools en cétones

Composé	$[M]_D$	$\Delta[M]_D$
Semicarbazone de la scilliglaucosidine-(19)	+ 260° (M)	+ 248°
Semicarbazone de la scilliglaucosidine-3-one-(19)	+ 508° (M)	
Scilliglaucosidine-19-ol	- 52° (M)	+ 211°
Scilliglaucosidine-3-one-19-ol	+ 159° (M)	
Scillarénine	+ 65° (C)	+ 187°
Scillarénone	+ 252° (C)	
Δ^4 -Cholestène-3 β -ol.	+ 170° (B)	+ 172°
Δ^4 -Cholestène-3-one	+ 342° (C)	
Δ^4 -Cholestène-3 α -ol.	+ 467° (B)	- 125°
Δ^4 -Cholestène-3-one	+ 342° (C)	
Cholestérine (Δ^5 -Cholestène-3 β -ol)	- 151° (C)	+ 493°
Δ^4 -Cholestène-3-one	+ 342° (C)	
Epicholestérine (Δ^5 -Cholestène-3 α -ol)	- 145° (C)	+ 487°
Δ^4 -Cholestène-3-one	+ 342° (C)	

M = méthanol; C = chloroforme; B = benzène.

celui de la scillarénine. Pour cette dernière substance, cette réaction se déroule si facilement qu'il est pratiquement impossible d'obtenir de la scillarénine intacte par hydrolyse du scillarène A avec un acide. D'autre part la scilliglaucosidine ne se distingue de la scillarénine que par la présence en C10 d'un groupe aldéhyde à la place du groupe méthyle. Les différences que l'on observe dans le comportement chimique de ces deux substances ne peuvent être dues qu'à ce seul détail de structure.

Pour pouvoir prouver, sur une substance modèle, l'influence d'un substituant contenant de l'oxygène en C10 sur le groupe hydroxyle et sur la double liaison du cycle A, nous avons préparé, à partir de la strophanthidine, un 3- β -oxy- Δ^4 -stéroïde, porteur d'un groupe carboxyle en C10¹. Ce composé, l'ester méthylique du 19-acide- Δ^4 -5-anhydro-strophanthidinique, a un comportement très semblable à celui de la scilliglaucosidine. Ceci est valable aussi bien pour l'élimination du groupe hydroxyle en C3 que pour la réaction colorée de ROSENHEIM².



Ester méthylique du 19-acide- Δ^4 -5-anhydro-strophanthidinique

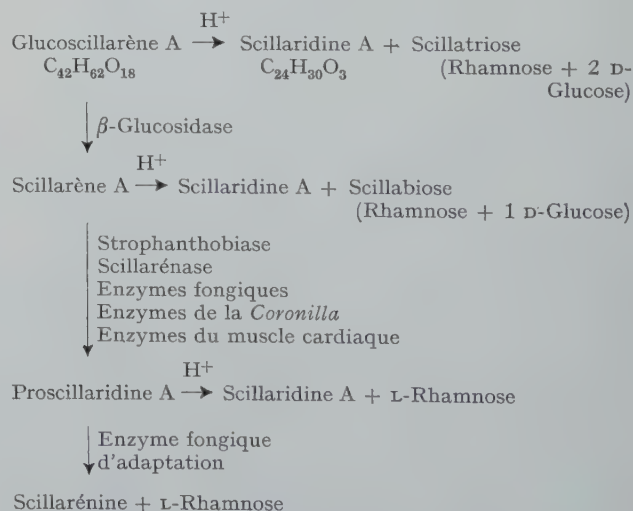
La différence de comportement entre la scillarénine et la scilliglaucosidine qui possède comme celui-ci une double liaison en position α par rapport à l'hydroxyle

en C3, a trouvé son explication par l'étude de la substance modèle obtenue par synthèse partielle. Ainsi se trouvent levés les derniers doutes qui planaient sur l'exactitude de la formule structurale de la scilliglaucosidine que nous avons indiquée plus haut.

La fraction glucidique des glucosides de la scille

Aussi diverse que se montre la scille maritime dans la production des aglucones, aussi modeste se révèle-t-elle en ce qui concerne les sucres qui sont liés aux aglucones. Le glucose et le méthyl-pentose rhamnose sont les uniques sucres qui aient été trouvés jusqu'ici dans les glucosides de la scille. Les deux tableaux (III et IV) rassemblent les équations de scission¹; on peut en déduire également les rapports des glucosides avec le même aglucone.

Tableau III. Les glucosides du groupe de Scillarène A



¹ A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 36, 1557 (1953).

² A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 36, 1565 (1953).

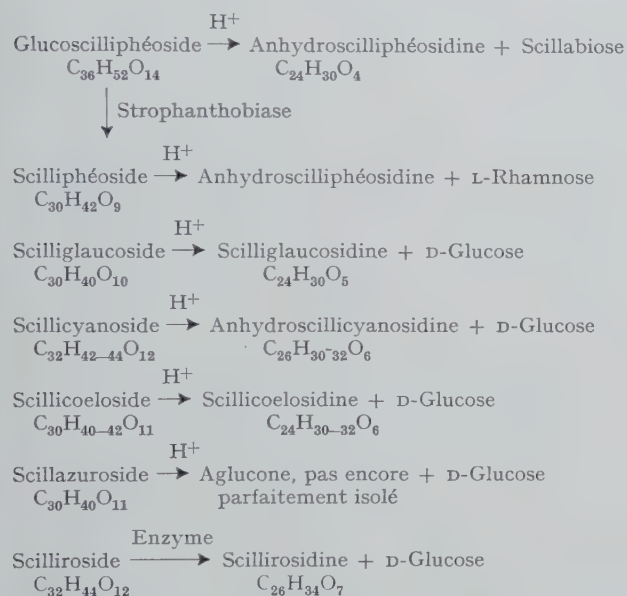
¹ A. STOLL, W. KREIS et A. VON WARTBURG, *Helv. chim. Acta* 35, 2495 (1952).

Le glucoside le plus riche en sucres est le gluco-scillarène A. Par hydrolyse acide il donne la scillaridine A et le scillatriose, qui se compose d'une molécule de rhamnose et de deux molécules de D-glucose. Le scillatriose est un des rares trisaccharides qui ait été trouvé jusqu'ici dans la nature et qui ait pu être cristallisé.

Par action de la β -glucosidase, le gluco-scillarène A peut être dégradé en scillarène A d'où, par hydrolyse acide, on isole le scillabiose composé de rhamnose et de glucose. En faisant agir des enzymes spécifiques, par exemple la scillarénase, le scillarène A est scindé en glucose et proscillaridine A, qui, de son côté, est séparée par des acides en scillaridine A et en rhamnose. Comme nous l'avons mentionné, l'hydroxyle en position 3 portant la chaîne glucidique est éliminé en formant une double liaison. Mais nous avons réussi, grâce à un enzyme adapté, à scinder la proscillaridine A en l'aglucone primaire, la scillarénine, et en rhamnose tout en conservant le groupe hydroxyle en C3.

Tableau IV

Glucosides qui accompagnent le glucoside principal, le scillarène A



Le gluco-scillarène A et le scillarène A mis à part, il n'y a plus que le gluco-scilliphéoside qui contienne encore plus d'un sucre, sous forme de scillabiose, dans le reste glucidique. Sous l'action de la strophanthobiasse il est transformé, par élimination d'une molécule de glucose, en scilliphéoside ne contenant plus que le rhamnose. Il faut également mentionner que, lors de la scission acide du gluco-scilliphéoside et du scilliphéoside, un groupe hydroxyle est éliminé avec le sucre, il s'agit probablement de l'hydroxyle portant la chaîne glucidique. Les autres glucosides isolés jusqu'à présent de la scille maritime, le scilliglaucoside, le scillicyanoside, le scillicoeloside, le scillazuroideside et le scilliroside ne contiennent qu'une molécule de glucose

en fait de reste glucidique. Comme nous verrons plus loin, ce n'est que grâce à des enzymes étrangers qu'il a été possible de transformer le scilliroside en aglucone intact, la scillirosidine, et en D-glucose¹.

A ce propos, nous allons examiner rapidement l'emploi d'enzymes étrangers, c'est-à-dire d'enzymes n'étant pas associés aux glucosides dans la nature, mais qui, ces derniers temps, nous ont rendu de précieux services pour séparer de l'aglucone le reste glucidique.

Au cours de nos recherches sur les substances cardiotoniques des semences de *Coronilla glauca* nous avons trouvé un système enzymatique permettant de rompre facilement la liaison entre le glucose et l'aglucone¹, tandis que c'étaient justement les glucosides dont l'aglucone porte un glucose qui, lors de la scission acide, nous opposaient de grandes et quelquefois d'insurmontables difficultés. Ainsi le scilliroside a pu être scindé facilement en glucose et en scillirosidine au moyen d'enzymes tirés des semences de *Coronilla*¹. Le même effet fut obtenu par des enzymes tirés des semences de luzerne (*Medicago sativa* L.)¹, bien que les semences de luzerne ainsi que les autres parties de la plante ne contiennent aucun glucoside cardiotonique. Nous avons également trouvé dans un grand nombre de champignons inférieurs du groupe des hyphomycètes et même dans le champignon de l'ergot de seigle, le *Claviceps purpurea*, des systèmes enzymatiques capables de scinder le glucose contenu dans des glucosides cardiotoniques². Des extraits d'organes animaux, tels que le rein, le foie, la rate et le cœur, peuvent également séparer du glucose de différents glucosides cardiotoniques, particulièrement de ceux qui sont employés en thérapeutique³. Il est assez remarquable que le myocarde, au niveau duquel agissent les glucosides, possède un système enzymatique séparant le glucose, contrairement aux muscles du squelette. Les glucosides de la scille maritime, contenant le cycle lactonique hexagonal à deux doubles liaisons, se laissent dégrader plus facilement par des enzymes étrangers que les glucosides de la digitale et du strophanthus contenant le cycle lactonique pentagonal à une seule double liaison. Le scilliroside, dont la scission acide ne peut être effectuée sans la destruction de l'aglucone, convenait très bien aux expériences avec les systèmes enzymatiques mentionnés.

En revanche, de tous ces systèmes enzymatiques, aucun n'était capable d'attaquer la liaison entre l'aglucone et le rhamnose dans le scillarène A et la proscillaridine A. C'est pourquoi nous avons eu l'idée de cultiver sur des milieux nutritifs, ne contenant en guise de source de carbone que du rhamnose au lieu de glucose, une souche de *penicillium* particulièrement

¹ A. STOLL et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 33, 286 (1950).

² A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, *Helv. chim. Acta* 34, 397 (1951).

³ A. STOLL et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* 34, 782 (1951).

appropriée et cultivée auparavant dans un milieu contenant du glucose, afin de l'accoutumer au rhamnose¹.

Au début, le champignon 889, espèce de *penicillium* du groupe *asymmetrica divaricata*, ne se développa que difficilement sur le bouillon de culture qui, à part la peptone, ne contenait que 2% de rhamnose. Mais déjà après le deuxième repiquage sur les mêmes bouillons de culture il se développa plus abondamment et après cinq générations montra une bonne croissance. Après plusieurs autres repiquages sur des bouillons de culture contenant du rhamnose, on examina séparément la solution nutritive et le mycélium du point de vue de leur pouvoir de scission enzymatique sur les glucosides. C'est surtout la solution nutritive qui s'avéra capable de séparer du rhamnose de la proscillaridine et de libérer pour la première fois l'aglucone primaire, la scillarénine.

Dans le cas de cette faculté acquise de scinder un rhamnoside il ne s'agit pas d'une sélection mutative, mais plutôt de la formation d'un enzyme adapté, car la souche de champignons conserve intact son pouvoir de scinder les glucosides contenant du glucose et perd son pouvoir de scission sur les rhamnosides déjà après deux repiquages sur des milieux nutritifs contenant du glucose. Avec l'adaptation au rhamnose, comme source de carbone, le champignon a acquis la faculté de former un enzyme capable de scinder un rhamnoside.

Pharmacologie et clinique des substances cardiotoniques de la scille maritime. L'efficacité des glucosides cardiotoniques est déterminée aujourd'hui en général par comparaison avec la méthode de HATCHER, qui consiste en une

infusion intraveineuse lente (par exemple 1 cm³ par minute d'une solution diluée du glucoside à 1:50 000) à des chats jusqu'à arrêt du cœur. C'est en fait une détermination de la toxicité, mais, comme elle s'effectue chez l'animal entier et qu'elle est très facilement reproductible, elle fournit cependant, sur l'action cardiaque et circulatoire des glucosides, des indications permettant d'entreprendre des essais cliniques.

Nous avons rassemblé dans les Tableaux V et VI la toxicité des glucosides cardiotoniques à lactones hexa- et pentacycliques – toxicité déterminée selon HATCHER –, et les avons classés en groupes de même aglucone, et ordonnés suivant la teneur décroissante en sucres. Le glucoside figurant au début d'un groupe est, par conséquent, le plus riche en sucres, tandis que la dernière ligne désigne l'aglucone du groupe. Dans la deuxième colonne du tableau sont indiqués les sucres contenus dans les glucosides, dans la troisième les poids moléculaires (P.M.). La quatrième colonne indique les doses-chat de HATCHER, exprimées en milligrammes par kilogrammes, qui suffisent pour provoquer l'arrêt du cœur. La cinquième colonne contient l'inverse des valeurs des doses HATCHER et désigne la toxicité spécifique. Ces chiffres indiquent en kilogrammes le poids théorique d'un chat que tuerait l'infusion intraveineuse de 1 mg de substance. Dans la sixième colonne, on a rapporté les doses de HATCHER aux millimoles par kilogramme $\times 10^3$ de chat. Nous désignons sous le nom de «toxicité moléculaire» (colonne 7) la valeur qu'on obtient en multipliant la toxicité spécifique par le poids moléculaire $\times 10^{-3}$. Cette valeur signifie donc le poids théorique en kilogrammes d'un chat que tuerait l'infusion intraveineuse de 1 millimole $\times 10^{-3}$ de substance.

¹ A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, *Helv. chim. chim. Acta* **34**, 2301 (1951).

Tableau V. Toxicité de quelques glucosides et de leurs aglucones à lactone hexacyclique

1	2	3	4	5	6	7
	Sucres	P.M	mg/kg	Toxicité spéc.	Millim./kg $\times 10^3$	Toxicité mol.
Glucoscellarène A ¹	2 D-glucose 1 L-rhamnose	855	0,172	5,8	0,201	5,0
Scillarène A ¹	1 D-glucose 1 L-rhamnose	673	0,145	6,9	0,215	4,6
Proscillaridine A ¹	1 L-rhamnose	531	0,157	6,4	0,295	3,4
Scillarénine ²	0	384	0,125	8,0	0,326	3,1
Glucoscelliphéoside ¹	1 D-glucose 1 L-rhamnose	709	0,111	9,0	0,155	6,5
Scilliphéoside ¹	1 L-rhamnose	547	0,087	11,5	0,159	6,3
Scilliroside ³	1 D-glucose	621	0,120	8,3	0,194	5,2
Scillirosidine ³	0	459	0,057	17,5	0,124	8,1
Scilliglaucoside ⁴	1 D-glucose	561	0,069	14,5	0,123	8,1
Scilliglaucosidine ⁴	0	399	0,064	15,6	0,161	6,2
Hellébrine ⁵	1 D-glucose 1 L-rhamnose	725	0,104	9,6	0,142	7,0
Désglucohellébrine ⁵	1 L-rhamnose	563	0,087	11,5	0,155	6,5
Hellébrigénine ⁵	0	416	0,077	13,0	0,185	5,4

¹ A. STOLL et W. KREIS, *Helv. chim. Acta* **34**, 1431 (1951).

² A. STOLL, J. RENZ et A. BRACK, *Helv. chim. Acta* **34**, 2301 (1951).

³ A. STOLL et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* **33**, 286 (1950).

⁴ A. STOLL, A. VON WARTBURG et J. RENZ, *Helv. chim. Acta* **36**, 1531 (1953).

⁵ J. SCHMUTZ, *Helv. chim. Acta* **32**, 1442 (1949).

Tableau VI. Toxicité de quelques glucosides et de leurs aglucones à lactone pentacyclique

1	2	3	4	5	6	7
	Sucres	P.M.	mg/kg	Toxicité spéc.	Millim./kg × 10 ³	Toxicité mol.
Lanatoside A ¹	1 D-glucose	969	0,380	2,62	0,3926	2,56
	3 D-digitoxose					
Désacétyllanatoside A ²	1 D-glucose	927	0,337	2,98	0,364	2,75
	3 D-digitoxose					
Acétyldigitoxine-α ³	3 D-digitoxose	807	0,447	2,24	0,55	1,84
Digitoxine ¹	3 D-digitoxose	765	0,420	2,39	0,4597	2,18
Digitoxigénine ¹	0	374	0,424	2,4	1,134	0,88
Lanatoside B ¹	1 D-glucose	985	0,403	2,49	0,4065	2,46
	3 D-digitoxose					
Désacétyllanatoside B ²	1 D-glucose	943	0,369	2,72	0,39	2,57
	3 D-digitoxose					
Acétylgitoxine-α ⁴	3 D-digitoxose	823	0,525	1,91	0,635	1,57
Gitoxine ¹	3 D-digitoxose	781	0,727	1,37	0,932	1,07
Gitoxigénine ¹	0	390	1,850	0,54	4,7437	0,212
Lanatoside C ¹	1 D-glucose	985	0,280	3,58	0,2856	3,51
	3 D-digitoxose					
Désacétyllanatoside C ²	1 D-glucose	943	0,228	4,40	0,241	4,15
	3 D-digitoxose					
Acétyldigoxine-α ⁵	3 D-digitoxose	823	0,36	2,78	0,435	2,30
Acétyldigoxine-β ⁵	3 D-digitoxose	823	0,375	2,68	0,455	2,20
Digoxine ¹	3 D-digitoxose	781	0,280	3,58	0,3590	2,80
Digoxigénine ¹	0	390	0,253	3,96	0,6487	1,55
k-Strophanthoside ⁶	2 D-glucose	872	0,126	7,9	0,144	6,9
	1 D-cymarose					
k-Strophanthine-β ⁶	1 D-glucose	710	0,120	8,3	0,169	5,9
	1 D-cymarose					
Cymarine ⁶	1 D-cymarose	548	0,111	9,0	0,202	4,9
Strophanthidine ⁶	0	404	0,274	3,6	0,678	1,47
Chéirotoxine ⁷	1 D-glucose	699	0,1185	8,4	0,17	5,9
	1 D-lyxose					
Désglucochéirotoxine ⁸	1 D-lyxose	537	0,0964	10,4	0,18	5,6
Strophanthidine ⁶	0	404	0,274	3,6	0,678	1,47
Convallaside ⁹	1 D-glucose	713	0,215	4,6	0,300	3,3
	1 L-rhamnose					
Convallatoxine ¹⁰	1 L-rhamnose	551	0,079	12,6	0,143	7,0
Strophanthidine ⁶	0	404	0,274	3,6	0,678	1,47

¹ E. ROTHLIN, Schweiz. med. Wschr. 70, 577 (1940).

² A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 16, 1390 (1933).

³ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 35, 1318 (1952).

⁴ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 35, 1324 (1952).

⁵ A. STOLL et W. KREIS, Helv. chim. Acta 17, 592 (1934).

⁶ E. ROTHLIN, Münch. med. Wschr. 1939, 762.

⁷ H. SCHWARZ, A. KATZ et T. REICHSTEIN, Pharm. Acta Helv. 21, 250 (1947).

⁸ K. K. CHEN, F. G. HENDERSON et R. C. ANDERSON, J. Pharmacol. exp. Ther. 103, 420 (1951).

⁹ J. SCHMUTZ et T. REICHSTEIN, Pharm. Acta Helv. 22, 359 (1947).

¹⁰ K. K. CHEN, Ann. Rev. Physiol. 7, 677 (1945).

Si l'on compare les tableaux V et VI, il apparaît immédiatement que les glucosides et aglucones porteurs d'une lactone hexacyclique à deux doubles liaisons sont, en général, nettement plus actifs que ceux qui contiennent une lactone pentacyclique à double liaison unique. Ainsi, les glucosides qui dérivent de la digitoxigénine, dans le groupe du lanatoside A, ont une toxicité spécifique comprise entre 2,24 et 2,98, tandis que les valeurs correspondantes dans le groupe du scillarène A se situent entre 5,8 et 8. De même, les valeurs de la toxicité moléculaire vont pour le groupe du lanatoside A de 0,88 (digitoxigénine) à 2,75 (désacétyllanatoside A), tandis qu'elles se trouvent réparties de 3,1 (scillarénine) à 5,0 (glucoscillarène A) dans le groupe du scillarène A.

C'est donc parmi les glucosides de la scille maritime que se rencontrent les substances cardiotoniques les

plus actives qu'on ait trouvées jusqu'à ce jour dans la nature, par exemple le scilliglaucoside, d'une toxicité spécifique de 14,5 et d'une toxicité moléculaire de 8,1. Par scission du glucose dans la molécule du scilliroside se forme la scillirosidine, qui ne contient plus de sucre: elle se distingue par une dose HATCHER de 0,057 mg/kg, une toxicité spécifique de 17,5 et une toxicité moléculaire de 8,1.

L'élimination du sucre dans les familles des glucosides à lactone pentacyclique provoque, au contraire, fréquemment une forte diminution de l'activité. Par exemple, la scission des trois molécules de digitoxose de la digitoxine cause une chute de la toxicité moléculaire de 2,18 à 0,88. L'élimination des molécules de digitoxose de la gitoxine ramène la toxicité spécifique de 1,37 à 0,54 et la toxicité moléculaire, de 1,07 à 0,212, soit environ un cinquième de sa valeur primitive. Dans le

groupe du k-strophanthoside, la toxicité moléculaire diminue progressivement de 6,9 pour le glucoside le plus riche en sucres à 1,47 pour l'aglucone, c'est-à-dire la strophanthidine, en passant par les valeurs 5,9 pour la k-strophanthine- β et 4,9 pour la cymarine. On peut observer une diminution semblable dans le groupe de la chéirottoxine.

Comme nous l'avons mentionné, la régression de la toxicité moléculaire par diminution de la teneur en sucres est beaucoup plus faible pour les glucosides à lactone hexacyclique. On constate même que la toxicité moléculaire augmente du scilliroside à la scillirosidine, passant en effet de 5,2 à 8,1. La toxicité spécifique augmente sans exception pour les glucosides de la scille maritime ainsi que pour le groupe de l'hellébrine, en même temps que baisse la teneur en sucres, de sorte que les aglucones présentent toujours les valeurs les plus élevées.

On peut en conclure que la lactone hexacyclique à deux doubles liaisons joue un rôle beaucoup plus important pour l'activité cardiotonique que la lactone pentacyclique à double liaison unique des glucosides de la Digitale proprement dite et de leurs parents, par exemple les glucosides du Strophanthus.

A ce propos, nous nous permettons de rappeler que les venins de crapauds, la bufotaline par exemple, qui ne contiennent pas de chaîne glucidique, mais des cycles lactoniques hexagonaux non-saturés, fournissent des valeurs de toxicité d'importance analogue à celle des aglucones des glucosides de la scille, dans la méthode de perfusion selon HATCHER. Là encore, nous voyons l'importance du cycle lactonique hexagonal à deux doubles liaisons conditionnant la forte action sur le cœur.

En ce qui concerne l'emploi clinique des glucosides cardiotoniques, tandis qu'on dispose pour ceux de la Digitale et du Strophanthus d'une expérience approfondie s'étendant sur plusieurs décades, de tous les glucosides à lactone hexacyclique à deux doubles liaisons, seuls ceux de la scille blanche ont fait l'objet d'une étude étendue au lit du malade. La préparation employée à cet usage, le Scillarène, contient la totalité des glucosides cardiotoniques de la scille maritime, parmi lesquels le scillarène A prédomine, toutefois, au point de vue quantitatif. Comme, d'une part, les préparations destinées à l'usage clinique sont standardisées selon la méthode de HATCHER et que, d'autre part, les glucosides qui accompagnent le scillarène A ont une action de même nature que lui, on peut considérer le Scillarène du commerce, aux points de vue qualitatif et quantitatif, comme un médicament d'activité constante.

Sur le Scillarène nous possédons donc déjà une expérience clinique s'étendant sur quelques dizaines d'années, tandis que les essais cliniques avec l'un ou l'autre des aglucones primaires n'ont pu être entrepris que maintenant, c'est-à-dire depuis qu'ils ont été obtenus.

L'effet comparé de la préparation de scille maritime

montre qu'il est presque aussi rapide que celui de la strophanthine, mais le Scillarène a encore l'avantage de pouvoir être administré par voie gastrique.

L'action du Scillarène sur la fonction rénale mérite d'être mentionnée spécialement, car il augmente la diurèse de manière frappante, comparée à celle due aux autres glucosides. En effet, l'excrétion d'eau, de sel et de substances azotées est considérable et ne s'explique pas seulement par une amélioration de la fonction cardiaque, mais encore par une influence directe sur le rein. L'emploi du Scillarène comme diurétique azoturique a donc une importance toute particulière dans les maladies rénales proprement dites avec rétention urinaire et œdèmes. En ce qui concerne son effet sur l'excrétion urinaire, il dépasse même la théobromine. Seuls les diurétiques mercuriels se montrent supérieurs, en certains cas, au Scillarène. Par ailleurs, on connaît des cas dans lesquels le Scillarène fut efficace, tandis que les diurétiques mercuriels échouèrent. Cette propriété du Scillarène a fait ses preuves dans des néphropathies d'origines diverses.

D'autre part, le Scillarène n'est pas indiqué dans les insuffisances cardiaques tachycardiques, pour lesquelles on a recours à des glucosides à effet bradycardique, comme la digitoxine et ses dérivés, par exemple l'acétyl-digitoxine.

Selon des travaux récents, le Scillarène s'est révélé supérieur aux glucosides du Strophanthus dans la sténose mitrale, l'insuffisance aortique, l'insuffisance ventriculaire droite consécutive à la stase dans la circulation pulmonaire, puis dans l'angine de poitrine avec insuffisance myocardique ou coronaire, surtout parce qu'il est mieux toléré et provoque moins de symptômes secondaires, tels que troubles angineux, extrasystoles, fibrillations auriculaires et palpitations. Le Scillarène s'est encore montré très précieux dans les maladies de cœur chroniques et dans les insuffisances chez le vieillard, à la place du Strophanthus intraveineux, grâce à son efficacité par voie gastrique.

Ces quelques brèves informations sur l'usage des préparations de la scille maritime en médecine moderne confirment l'emploi et le grand cas que faisaient les anciens Egyptiens de la scille maritime comme médicament. Les produits purs et exactement dosables ont permis aux pharmacologues et aux cliniciens de délimiter certains domaines d'indications pour les produits de la Digitale et du Strophanthus employés plus généralement, et de montrer dans quelles indications la scille maritime est avantageuse. La diversité d'action réside, ainsi que nous l'avons montré, dans les différences de la constitution chimique et surtout dans celles de la structure du cycle lactonique.

Le cycle lactonique hexagonal avec deux doubles liaisons a été découvert d'abord dans le scillarène A, mais par la suite, également dans d'autres glucosides cardiotoniques d'origine végétale et dans les venins de crapauds.

L'exemple du scillarène A a permis de démontrer, par la voie la plus courte, la proche parenté des aglucones des glucosides cardiotoniques et des acides biliaires. La découverte d'enzymes spécifiques dans la scille maritime a rendu possible, d'une part la dégradation par étapes, et d'autre part la séparation d'une série de glucosides initiaux par inhibition de l'action enzymatique. Ce n'est que récemment qu'on a trouvé que les aglucones initiaux à cycle lactonique hexagonal non saturé exercent comme les venins de crapauds une forte action sur le cœur et ouvrent peut-être de nouvelles perspectives dans le traitement des cardiopathies.

La préparation à l'état de pureté et les recherches sur les substances cardiotoniques de la scille maritime ont d'un côté enrichi et approfondi nos connaissances de la structure de cette importante et intéressante classe des stéroïdes, et de l'autre, permis à la médecine moderne d'utiliser cette très ancienne drogue médicinale qui était presque tombée dans l'oubli.

Summary

After a short historical survey of the uses of *Scilla maritima* (*Urginea maritima*), a description is given of a special process of extraction which enables the initial cardioactive glycosides of squill to be isolated from the fresh drug in a pure state. The principal glycoside obtained is scillaren A, a homogeneous crystalline substance, while the mother liquors contain a glycosidal complex which can be separated by chromatography into eight different, homogeneous crystalline glycosides, viz. glucoscillaren A, glucoscilliphaeosid, scilliphaeosid, scillicoelosid, scillicyanosid, scilliglaucosid, scillazurosid and scillikryptosid. The active principle of red squill is scillirosid, a rat poison; this has likewise been obtained in a pure crystalline condition.

The aglycones of the squill glycosides are characterized by the presence of a lactone ring of the cumalin type containing two double bonds, since they behave in a similar manner to cumarin when treated with alcoholic alkalis. This lactone ring creates a fundamental distinction between the squill glycosides and the glycosides of digitalis and strophanthus; its presence in scillaren A and its nature were first recognized by STOLL *et al.* Other workers then showed that the same lactone ring is also present in the toad poisons and later it was found in the glycosides of *Helleborus*, *Urginea rubella* and *Bowiea volubilis*.

On catalytic hydrogenation the cumalin ring behaves as an enol-lactone ring and undergoes reductive cleavage yielding a saturated desoxy-acid. By a straightforward reaction, anhydroscillaridin A is converted in this way to allocholanic acid, while scillaren A itself yields epiallo-lithocholic acid. In this manner it was possible to

effect for the first time the elegant conversion of a cardiac glycoside to a steroid without loss of a carbon atom, and thus to clarify the structure of scillarenin, the aglycone of scillaren A.

A constitutional formula for scillirosid is proposed and it is highly probable that this corresponds to the actual conditions.

Scilliglaucosidin differs from scillarenin only in the presence of an aldehyde group at C 10 in place of the angular methyl group.

The sugar residue of glucoscillaren A is made up of two D-glucose residues and one L-rhamnose residue. In the case of scillaren A and of glucoscilliphaeosid, the sugar residue consists of one molecule of L-rhamnose and one molecule of D-glucose. Proscillaridin A and scilliphaeosid consist only of the aglycone and one molecule of L-rhamnose. All the remaining squill glycosides contain only a single molecule of D-glucose as sugar fraction.

Acid cleavage of glucoscillaren A yields scillatriose, while scillaren A and scilliphaeosid yield scillabiose; the remaining glycosides being monosides yield either L-rhamnose or D-glucose. Except in the case of scilliglaucosid and scillicoelosid, however, the aglycones cannot be obtained intact.

The terminal glucose molecules can be split off enzymatically: strophantobiase converts glucoscillaren A to proscillaridin A and glucoscilliphaeosid to scilliphaeosid. The enzyme β -glucosidase from emulsin splits off D-glucose from glucoscillaren A leaving scillaren A which, in turn, is converted by scillarenase to proscillaridin A.

All these enzymes leave the glycosidal linkage between the aglycone and the glucose intact. On the other hand, enzymes obtained from the seeds of *Coronilla glauca* and from lucernes (*Medicago sativa* L.) are also capable of breaking this linkage e.g. in scillirosid.

Numerous lower fungi belonging to the group of hyphomycetes contain enzymes which also catalyze this cleavage. Similar enzymes are found in ergot and in extracts of animal organs, such as the kidney, liver, spleen and heart muscle.

If penicillium strain 889 (*Penicillium spec.*, group *Asymmetrica*, *Divaricata*) is grown on a medium containing L-rhamnose as a source of carbon, it produces an adaptive enzyme which splits proscillaridin A into L-rhamnose and scillarenin.

In the last part of the paper, the toxicities of the various squill glycosides and aglycones are compared with one another and with the glycosides of digitalis and strophanthus. The concepts of specific and molar toxicities are introduced and defined. The six-membered lactone ring with two double bonds present in the squill glycosides is of greater importance for the cardiac activity than the butenolid ring, since degradation to the aglycones results in a much smaller decrease in molar toxicity in the case of the squill glycosides than in the case of the glycosides of digitalis and strophanthus.

The paper concludes with a note on the clinical applications of the squill glycosides.

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Rauwolfia Alkaloids, XI¹, Isolation of an Isomer of Yohimbine

Further investigations of the alkaloids of *Rauwolfia serpentina* Benth. have resulted in the isolation of another isomer of yohimbine². This base was obtained from ajmaline mother liquors (solution A)³. Purification of the crude alkaloid was accomplished by chromatography and crystallization from methanol-water. The base could be obtained in either of two crystalline forms melting at 125–128° and 181–183°. The infrared spectra (in chloroform) were identical and also $[\alpha]_D^{26}$ –96° (in pyridine) was the same for both forms. Analyses of the two forms were identical and indicated an empirical formula of $C_{21}H_{26}O_3N_2$. (Calculated: C, 71.16; H, 7.39; N, 7.90; OCH_3 , 8.75. Found for low melting form: C, 70.94; H, 7.39; N, 7.96; OCH_3 , 8.51. Found for high melting form: C, 71.06; H, 7.65; N, 7.77). The following infrared bands were observed (Nujol): inflection at 3527 cm^{-1} (OH); bands at 3365 (NH), 1720 (CH_3OOC-), and 738 (ortho-disubstituted benzene ring). Ultraviolet spectrum (ethanol): maxima (in $m\mu$) at 226 (34240), 282 (7760), and 290 (6730); minima at 248 (2300) and 288 (6520).

The following derivatives have been prepared and their analytical values support the above empirical formula: hydrochloride, m.p. 235–240° (decomp.), $[\alpha]_D^{26}$ –75°; methiodide, m.p. 233–236° (decomp.); monoacetate, m.p. 180–181° (containing half a mole of benzene of crystallization), $[\alpha]_D^{26}$ –124°; diacetate, m.p. 193–195°, $[\alpha]_D^{26}$ –102°; benzoate, m.p. 230–231°; benzoate hydrochloride, m.p. 246–248°; hydrazide, m.p. 288–295°, $[\alpha]_D^{26}$ –93° (all rotations in pyridine except the base hydrochloride in water).

Alkaline saponification yielded the corresponding acid, isolated as the hydrochloride, m.p. 258°, $[\alpha]_D^{26}$ –98° (in water). Esterification with diazomethane reformed the starting material. OPPENAUER oxidation with aluminium phenoxide yielded a ketone, m.p. 247–250°, $[\alpha]_D^{26}$ +163° (pyridine). (Calculated for $C_{19}H_{20}ON_2$: C, 77.51; H, 7.53. Found: C, 77.71; H, 7.63). Infrared spectrum (Nujol): bands at 3356 cm^{-1} (NH), 1701 (CO), and 742 (ortho-disubstituted benzene ring).

The higher melting form of this yohimbine isomer, its hydrochloride, and methiodide agree in melting point with the published values of ajmalinine and its corresponding derivatives⁴. Although the rotations of the hydrochlorides differ by 31°, the rotations of the free bases are identical.

The reported ajmalinine formula ($C_{22}H_{26}O_3N_2$) differs from the yohimbine formula by one C-atom. Further investigations of this alkaloid⁵ are in progress.

F. E. BADER, D. F. DICKEL,
R. A. LUCAS, and E. SCHLITTLER

Research Department, Ciba Pharmaceutical Products, Inc., Summit, N. J., April 21, 1954.

¹ Communication X, E. SCHLITTLER *et al.*, Exper. 10, 133 (1954).

² A. HOFMANN, Helv. chim. Acta 37, 314 (1954). - F. E. BADER *et al.*, J. Amer. chem. Soc. 76, 1695 (1954).

³ L. DORFMAN *et al.*, Helv. chim. Acta 37, 59 (1954).

⁴ S. SIDDIQUI and R. H. SIDDIQUI, J. Indian chem. Soc. 12, 37 (1935).

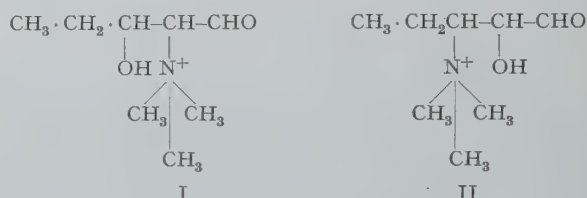
⁵ Designated as alkaloid 3078.

Zusammenfassung

Aus Ajmalin-Mutterlaugen von *Rauwolfia serpentina* Benth. ist ein weiteres Isomeres des Yohimbins isoliert worden. Das Alkaloid besitzt zwei verschiedene Kristallformen, wovon die höher schmelzende in ihren Eigenschaften weitgehend dem Ajmalinin gleicht. Spektren und Derivate werden beschrieben.

Zur Kenntnis des Muscarins

Für Muscarin, den Giftstoff des Fliegenpilzes [*Amanita muscaria* (L. ex Fr.) Qué.] stehen seit über 20 Jahren die von KÖGL, DUISBERG und ERXLÉBEN¹ aufgestellten Formeln I und II ($C_8H_{18}O_2N^+$) zur Diskussion.



Sie wurden hergeleitet aus der Analyse des Reineckates, der positiven Aldehydreaktion nach SCHIFF und ANGELI-RIMINI und aus dem Hofmannschen Abbau, welcher Trimethylamin und α, β -Dioxyvaleriansäure ($CH_3CH_2CHOH \cdot CHOH \cdot COOH$) ergeben haben soll. Aus verschiedenen Gründen sind diese Formeln angezweifelt worden. Sie konnten auch nicht durch Synthesen bestätigt werden².

Wir haben die Bearbeitung des Muscarins aufgenommen und sind zu teilweise abweichenden Resultaten gekommen, weshalb wir unsere Ergebnisse kurz mitteilen wollen.

Gang der Aufarbeitung: frische Pilze wurden unter Alkohol rasch fein zerhackt und die Alkoholextrakte im Vakuum (Dünnschichteneindampfer) konzentriert. Den wässrigen Sirup trennten wir in alkohol-leichtlösliche und -schwerlösliche Teile. Die biologische Aktivität befand sich im leichtlöslichen Teil. Nach Konzentrieren und Entfetten ergab sich ein wässriges Konzentrat, woraus Muscarin mit einem Gemenge inaktiver Basen als Reineckat abgeschieden wurde. Nach dessen Überführung in die Chloride wurde an Cellulosekolonnen mit Butanol-Pyridin-Wasser- und Butanol-Ammoniak-Wasser-Gemischen aufgetrennt. Alle Stufen und Fraktionen wurden pharmakologisch und später papierchromatographisch kontrolliert. Aus den weitgehend reinen und völlig cholinfreien Konzentraten kristallisierten wir das Muscarin als Tetrachloraurat. Nach dessen Umwandlung ins Chlorid liess sich dieses aus Isopropanol-Aceton erstmals kristallisieren (siehe Abb. 1). Ausbeute 70 % der

¹ F. KÖGL, H. DUISBERG und H. ERXLÉBEN, Liebigs Ann. Chem. 489, 156 (1931).

² Siehe zum Beispiel F. KÖGL und H. VELDSTRA, Liebigs Ann. Chem. 552, 1 (1942).

durch pharmakologischen Test im wässrigen Konzentrat festgestellten Menge.

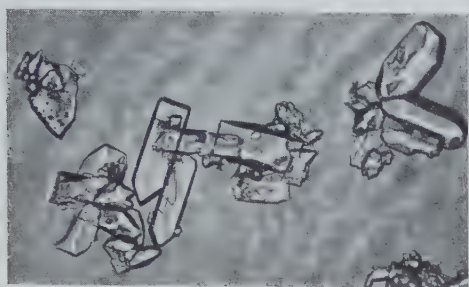


Abb. 1. Muscarinchlorid.

Unsere Analysen passen besser auf $C_9H_{20}O_2N^+$ als auf $C_8H_{18}O_2N^+$.

Chlorid, Smp. 181–182°

$C_9H_{20}O_2N^+Cl^- \cdot \frac{1}{2}H_2O$ (getr. 20°, 0,001 mm)

berechnet C 49,42 H 9,68 N 6,41 %

gefunden 49,96 9,36 6,18 %

$C_9H_{20}O_2N^+Cl^-$ (getr. 70°, 0,001 mm)

berechnet C 51,54 H 9,62 %

gefunden 51,37 9,89 %

Tetrachloraurat, Smp. 121–121,5°

$C_9H_{20}O_2N^+AuCl_4^-$

berechnet C 21,06 H 3,93 N 2,73 Au 38,42 %

gefunden 20,81 3,89 2,74 39,13 %

Reineckat, Smp. 181–182° (vak.)

$C_9H_{20}O_2N^+[Cr(SCN)_4(NH_3)_2]^-$

berechnet C 31,69 H 5,32 N 19,90 %

gefunden 32,31 5,47 20,12 %

$[\alpha]_D^{20} + 6,7^\circ$ (Wasser).

KÖGL *et al.* gaben $[\alpha]_D^{20} + 1,57^\circ$ (Wasser).

Reines Muscarinchlorid gibt keine Aldehydreaktionen nach SCHIFF und ANGELI-RIMINI; es reagiert nicht mit Dinitrophenylhydrazin in 2n HCl; die einer Carbonylgruppe entsprechenden Absorptionsbanden fehlen im UV. und IR.; Natriumborhydrid in Methanol und Platin-Wasserstoff in Äthanol lassen Muscarin unverändert; Silberdiamin in verdünntem Ammoniak wird nicht reduziert; somit ist die immer wieder diskutierte Aldehydgruppe im Muscarin nicht vorhanden. Auch das mit verdünnter Salzsäure behandelte Muscarinchlorid gibt keine Aldehydreaktionen, was normale Acetalformeln in Frage stellt. Muscarinhydroxyd ist in siedender, wässriger Lösung weitgehend stabil. Dadurch werden Trialkylalkoxy-Verbindungen¹ ausgeschlossen.

Muscarin ist ein quartäres Alkaloid, wie schon SCHMIEDEBERG und HARNACK² angenommen haben, denn die Pyrolyse ergibt das pharmakologisch kaum aktive Normuscarin [Öl, Sdp. etwa 130° (Badtemperatur) / 0,002 mm, Hydrochlorid, Smp. 144–145°], dessen Quaternisierung wieder zum Muscarinchlorid führt (Smp. Mischsmp. R_F -Wert, Chloroaurat, pharmakologischer Test).

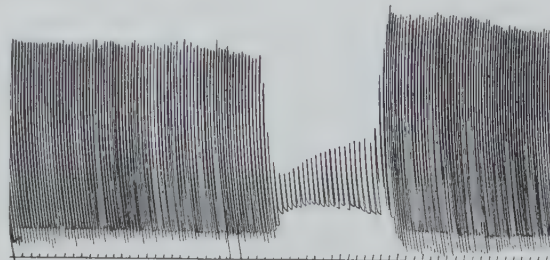
Der Hofmannsche Abbau (Kochen mit Ag_2O) gibt flüchtige Basen, aber nicht Trimethylamin, wie KÖGL *et al.* glaubten nachgewiesen zu haben. Auch mit der KOH-Schmelze konnten wir dieses nicht nachweisen.

Bei der Chromsäureoxydation fanden wir unter den wasserdampfflüchtigen Säuren nur Essigsäure. Propionsäure, welche aus einer α, β -Dioxyvaleriansäure erwartet werden müsste, konnte auch nicht in Spuren festgestellt werden.

Wir möchten betonen, dass durch die pharmakologische Untersuchung die Anwesenheit nur *einer* Base mit Muscarinwirkung festgestellt werden konnte. Unsere von KÖGL *et al.* abweichenden Resultate beruhen eher auf verschiedenem Reinheitsgrad der verwendeten Muscarinpräparate als auf einer grundsätzlichen Verschiedenheit der Giftstoffe. KÖGL hat offenbar nur im Chloroaurat ein annähernd reines Muscarinsalz in Händen gehabt, welches er aber wegen der gegenüber dem Reineckat abweichenden Analysenresultate und der geringen Ausbeute als zersetzt betrachtete. Sein Chloroaurat schmolz bei 115–117°¹.

Auch KING² hatte offensichtlich weitgehend reines Muscarinchloroaurat isoliert (gefunden 38,6% Au, daraus Äquivalentgewicht des Chlorids 210). Ferner sprechen für eine Gleichartigkeit der an verschiedenen Orten isolierten Muscarinpräparate die übereinstimmende biologische Wirkung.

Der pharmakologische Nachweis einer Anreicherung bei der Aufarbeitung, die Identifikation in Chromatogrammen und die Aktivitätsbestimmung wurde mit Straubschen Froschherzen (*Rana temporaria*) durchgeführt. Ventrikel und Aortenkanüle enthielten 1 ml der mit Ringerlösung verdünnten Extrakte oder Reinalkaloidlösungen (18°, mit Sauerstoff durchspült).



Muscarin-Cl 0,01 γ ; Atropin

Abb. 2. Verkleinerung der Herzamplitude (*Rana temporaria*) und Verlangsamung der Schlagfrequenz durch Muscarin, antagonisiert durch Atropin.

Die durch Muscarin bedingte Verminderung der Hubhöhe und Verlangsamung der Schlagfrequenz des Froschherzens wird durch Atropin in minimaler Konzentration von 10^{-8} aufgehoben (Abb. 2). Nach KÖGL, DUISBERG und ERXLEBEN ist als Muscarineinheit (ME.) diejenige Menge definiert, welche in 1 ml gelöst, die Herzamplitude auf 75% des Ausgangswertes vermindert (Abb. 3). Bei 32–50 g schweren Temporarien entspricht in unseren Versuchen im März–April 1 ME. dem statistisch gesicherten Wert von $0,0042 \pm 0,00032 \gamma$ reines Muscarinchloridhydrat.

1 g Muscarinchlorid enthält demnach $238 \cdot 10^6$ ME. KÖGL *et al.* erhielten mit Esculentenherzen im Februar niedrigere Werte: 1 g ihres Muscarinchlorides entsprach $175 \cdot 10^6$ ME. Beim Frosch mit Thoraxfenster bewirkt 0,3–0,4 mg/kg Muscarinchlorid intralymphal diastolischen Herzstillstand in 4–10 min, der durch 1 Tropfen einer Atropinlösung ($5 \cdot 10^{-6}$) auf das Herz aufgehoben wird. DALE³ brauchte für die gleiche Wirkung bei Escu-

¹ E. F. ROGERS, D. BOVET, V. G. LONGO und G. B. MARINI-BETTOLO, Exper. 9, 260 (1953).

² O. SCHMIEDEBERG und E. HARNACK, Arch. exp. Path. Pharm. 6, 101 (1877).

¹ F. KÖGL und H. VELDSTRA, Liebigs Ann. Chem. 552, 36 (1942).

² H. KING, J. Chem. Soc. 1922, 1743.

³ H. DALE, J. Pharm. exp. Ther. 6, 147 (1914).

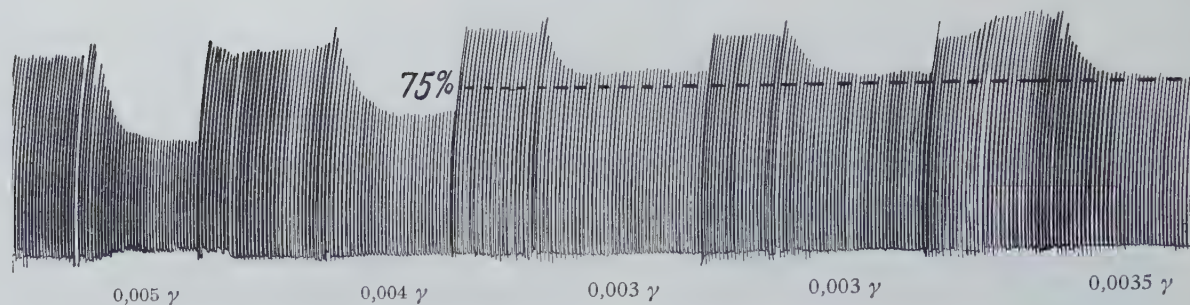


Abb. 3. Quantitative Muscarinbestimmung am Strauschen Froschherzen: 25% Lähmung durch 0,0035 γ Muscarinchlorid (= 1 Muscarineinheit).

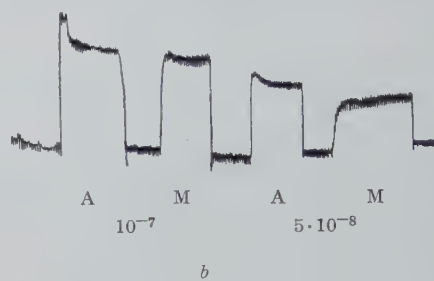
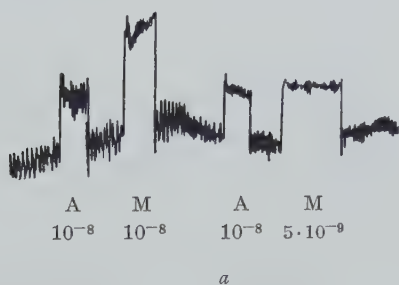


Abb. 4. Acetylcholin- (A) und Muscarinchlorid-Wirkungen (M) am Kaninchen- (4a) und Katzendarm (4b).

lenten 0,38 mg/kg, KÖGL ebenfalls bei Esculenten 0,16–0,23 mg/kg.

Der isolierte Kaninchendarm (Ileum) kontrahiert sich bei einer Grenzkonzentration von 10^{-9} . Der Vergleich mit Acetylcholin ergibt eine doppelt so starke Wirkung durch Muscarin auf den Darmtonus des Kaninchens (Abb. 4a), während bei der Katze die Kontraktionen durch Muscarin etwas schwächer als die durch Acetylcholin bewirkten sind (Abb. 4b). KING fand für sein Muscarinchlorid submaximale Kontraktion des Kaninchendarmes mit $6,7 \cdot 10^{-7}$ und einen erkennbaren Effekt mit $6 \cdot 10^{-8}$.

Auch die blutdrucksenkende Wirkung des Muscarinchlorids bei der Katze ist stärker als diejenige des Acetylcholins. Die minimale depressive Dosis beträgt intravenös 0,002 γ /kg (Acetylcholin 0,005 γ /kg). Bei gleichen Mengen wirkt Muscarin etwa doppelt so stark wie Acetylcholin, und die Blutdrucksenkung dauert 2–3mal länger. Die gleiche Blutdrucksenkung tritt auch nach Vagusdurchtrennung auf. Die Atmung wird durch Dosen über 0,02 γ /kg gesteigert: das Atemvolumen ist vergrößert, die Frequenz erhöht. Oberhalb 1 γ /kg wird sie durch Bronchokonstriktion vermindert und steht still nach 10 γ /kg. Atropin hebt diese tödliche Wirkung auf, so dass sich Atmung und Blutdruck innerhalb einiger Minuten beinahe vollständig erholen. Auch durch Muscarin bedingte Miosis und Speichelfluss werden durch Atropin verhindert.

Die Muskelendplatten werden auch bei diesen grossen Muscarinmengen ($> 10 \gamma$ /kg) nicht beeinflusst, wie auch die Überleitung autonomer Synapsen (Ganglion cervicale superius) unverändert bleibt.

Zusammenfassend kann aus diesen Versuchen die reine, periphere, parasympathomimetische Muscarinwirkung folgendermassen charakterisiert werden: Starke Blutdrucksenkung, auch nach Vagektomie. Verlangsamung der Herztätigkeit bis zum diastolischen Stillstand. Beschleunigung der Atmung, Bronchokonstriktion. Erhöhung des Darmtonus. Fehlen von curare- oder nikotinartiger Wirkung. Der Vergleich der Wirkungsstärke

mit früher beschriebenen Muscarinsalzen anderer Autoren zeigt, dass das untersuchte reine Muscarinchlorid meistens stärker wirksam ist.

Die ausführliche Beschreibung dieser Versuche und weitere chemische und pharmakologische Untersuchungen werden an anderen Stellen veröffentlicht.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds und der Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz für die Unterstützung dieser Arbeit.

C. H. EUGSTER und P. G. WASER

Chemisches Institut und Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, den 22. April 1954.

Summary

The alkaloid muscarin was isolated from fly agaric. The analyses of crystallized salts (chloride, tetra-chloroaurate, REINECKE's salt) led to $C_9H_{20}O_2N^+$ as the simplest formula. The presence of aldehyde and tri-methylammonium groups, which had been assumed hitherto, could not be proved. The quaternary nature of the nitrogen atom was shown. Pharmacological tests on frog heart, rabbit gut and cats show the purely peripheral parasympathomimetic effect of the smallest doses.

Über die Molekulargrösse des Hämovanadins¹

(Untersuchungen über den vanadiumhaltigen Blutfarbstoff, III)

Hämovanadin, der von MARTIN HENZE² in *Phallusia mamillata* Cuvier entdeckte, vanadiumhaltige Blutfarb-

¹ Dem Entdecker des Hämovanadins zum 80. Geburtstag gewidmet.

² M. HENZE, Z. physiol. Chem. 72, 494 (1911).

stoff von Aszidien ist nach unseren Untersuchungen¹ ein Sulfatkomplex des 3wertigen Vanadiums in chromoproteidartiger Bindung. Bei der Hämolyse der Blutzellen, die praktisch das gesamte Vanadium der Tiere enthalten², geht das Hämovanadin mit braunroter Farbe in Lösung. Es lässt sich aus dem mit destilliertem Wasser bereiteten Hämolyolat (Henzelösung) mit reinem Azeton in einem braunen Präzipitat niederschlagen³. Wegen ihrer Schwerlöslichkeit in Wasser eignen sich weder das braune Präzipitat noch die das Vanadium in der 4wertigen Stufe enthaltenden Oxydations- und Abbauprodukte des Hämovanadins (HENZES Chromogen, blaugrünes und grünes Präzipitat)⁴ zur Molekulargewichtsbestimmung. Wir haben daher zur Ermittlung der Molekulargröße des Hämovanadins die Henzelösung herangezogen. Gemessen wurde die Diffusionsgeschwindigkeit nach den Angaben von NORTHPROP und ANSON⁵, einer Methode, die sich besonders für Substanzen eignet, welche nicht völlig rein von unspezifischen Begleitstoffen erhalten werden können, wie dies offenbar beim braunroten Hämovanadin in der Henzelösung der Fall ist. Aus dem Diffusionskoeffizienten erhält man mit Hilfe der Einsteinschen Gleichung⁶ den Molekelradius sphärischer Moleküle und daraus das Molekulargewicht.

Methode. Apparatur und Eichung. Als Diffusionszelle (28,4 ml) diente ein Schottisches Glasfilter G3 (poröse Membran 2,5 × 30 mm), das am oberen Ende mit einem Hahn verschlossen werden konnte. Die Zelle tauchte in eine Vorlage mit dem Lösungsmittel, das durch Überleiten von reinem Kohlendioxyd [Entfernung des O₂ mittels einer Lösung von Vanadin(II)-sulfat] sauerstofffreies Arbeiten gestattete. Zur Eichung der Apparatur, die nur relative Diffusionskoeffizienten liefert, haben wir 1*N* NaCl benutzt, dessen Diffusionskoeffizienten ÖHOLM⁷ zu $D_{50} = 83,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt hat. Gemessen wurde die Menge an diffundiertem Natriumchlorid durch Titration der Chlorionen nach den Angaben von VOLHARD⁸. Mit der von NORTHPROP und ANSON⁹ abgeleiteten Gleichung ergab sich daraus für eine Messtemperatur von 5°C eine Apparatekonstante $K = D \cdot t / Q_{\text{ml}} = 0,0535 \pm 0,0010$ (Tab. I).

Tabelle I. Eichung der Diffusionszelle mit 1*N* NaCl-Lösung.

Diffusionsdauer t s	ml Ausgangslösung diffundiert Q_{ml}	Apparatekonstante K bei 5°C
210	0,0321	0,0545
140	0,0218	0,0535
240	0,0381	0,0525
180	0,0282	0,0532

¹ H.-J. BIELIG und E. BAYER, Liebig's Ann. Chem. 580, 135 (1953).
– H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954).

² H. BALTSCHIEFFSKY und M. BALTSCHIEFFSKY, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 24, 447 (1953).

³ M. HENZE, Z. physiol. Chem. 79, 215 (1912).

⁴ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954). – L. CALIFANO und P. CASELLI, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 21, 235 (1948).

⁵ J. H. NORTHPROP und M. L. ANSON, J. Gen. Physiol. 12, 543 (1929). – M. L. ANSON und J. H. NORTHPROP, J. Gen. Physiol. 20, 575 (1937).

⁶ A. EINSTEIN, Z. Elektrochemie 14, 235 (1908).

⁷ L. W. ÖHOLM, Z. physikal. Chem. 50, 309 (1905).

⁸ J. VOLHARD, J. prakt. Chem. 117, 217 (1874).

⁹ J. H. NORTHPROP und M. L. ANSON, J. Gen. Physiol. 12, 543 (1929).

Um sicher zu sein, dass die mit Natriumchlorid gewonnene Apparatekonstante K auch für hochmolekulare Substanzen (Proteine) gilt, haben wir zunächst die Diffusionskonstanten von kristallisiertem Oxyhämoglobin aus Rinderblut¹ und von Zytochrom c aus Rinderherz² mit der angegebenen Apparatur bei 5°C an Luft bestimmt. Gemessen wurden die diffundierten Mengen an Zytochrom c kolorimetrisch nach JUNOWICZ-KOCHOLATY und HOGNESS³, an Hämoglobin durch Vergleich der Extinktionen bei 540 und 575 m μ zwischen der Ausgangslösung und der jeweiligen Lösung in der Vorlage nach der Diffusion. Als Diffusionskoeffizienten und als Molekelradien ergaben sich für Hämoglobin $D_{50} = 4,99 (\pm 0,10) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $r = 2,66 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$ und für Zytochrom c $D_{50} = 8,29 (\pm 0,20) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $r = 1,60 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$. Diesen Werten entsprechen die folgenden Molekulargewichte: Hämoglobin $M = 64200 \pm 3000$ (für $d_4 = 1,33$); Zytochrom c $M = 13600 \pm 1300$ (für $d_4 = 1,30$). Die so auf der Eichbasis NaCl gefundenen Molekulargewichte stehen in guter Übereinstimmung mit dem für Säugetierhämoglobin angegebenen mittleren Molekulargewicht von 67000 (Rinderhämoglobin aus Osmoseversuchen⁴) und dem für Zytochrom c aus Sedimentationsdaten berechneten Molgewicht von 13200⁵.

Hämovanadinlösung und -bestimmung. Die zur Molekulargewichtsbestimmung des braunroten Hämovanadins benutzte Henzelösung, die frisch ein pH von 2,5–2,8 aufweist, haben wir aus gewaschenen Blutzellen von *Phallusia mamillata* durch Hämolyse mit destilliertem Wasser nach unseren früheren Angaben⁶ dargestellt. Einwandfreie Präparate erhält man nur aus frisch gefangenen Tieren bei raschem Arbeiten, da die mit der Oxydation des Hämovanadins aus dem Komplex freier werdende Schwefelsäure zur Abspaltung von Protein und unterhalb von pH 2 zur Lösung der komplexen Bindung des Vanadiums führt (denaturiertes Hämovanadin⁷). Als Lösungsmittel in der Vorlage verwendete man eine der Henzelösung im pH entsprechende Schwefelsäure. Die Diffusion geschah unter sauerstofffreiem Kohlendioxyd bei 5°C. Den relativen Hämovanadinhalt bestimmte man sicherer als durch Vergleich der Extinktionen beim Wendepunkt der Absorptionskurve im Gebiete von 420 m μ durch spektrophotometrische Messung der jeweiligen Vanadinmenge in Form des roten Hydroxo-oxo-di(8-oxychinolino)-vanadins(V)⁸.

In Tabelle II sind die Ergebnisse unserer Diffusionsversuche mit Henzelösungen von verschiedenem pH und verschiedener Konzentration an braunrotem Hämovanadin eingetragen. Hieraus ergibt sich, dass das braunrote Hämovanadin im pH-Bereich von 2,5–2,8 einen mittleren Diffusionskoeffizienten von $D_{50} = 6,87 (\pm 0,17) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und einen Molekelradius von

¹ Dargestellt nach den Angaben bei P. B. HAWK, B. L. OSER und W. H. SUMMERSON, *Practical Physiological Chemistry*, 12. Aufl. (The Blakiston Comp., New York 1947), S. 441.

² Bereitet nach D. KEILIN und L. F. HARTREE, Proc. Roy. Soc. London B 122, 298 (1937).

³ R. JUNOWICZ-KOCHOLATY und T. R. HOGNESS, J. biol. Chem. 129, 569 (1939).

⁴ J. ROCHE, A. ROCHE, G. S. ADAIR und M. E. ADAIR, Biochem. J. 26, 1811 (1932).

⁵ K. O. PEDERSEN, unveröffentlicht. Zitiert nach K. G. PAUL in J. B. SUMNER und K. MYRBÄCK, *The Enzymes* II, 1 (Academic Press, New York 1951), S. 375.

⁶ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954).

⁷ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954).

⁸ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954). – H.-J. BIELIG und E. BAYER, Liebig's Ann. Chem. 584, 96 (1953).

$r = 1,93(\pm 0,05) \cdot 10^{-7}$ cm aufweist. Unter Annahme eines spezifischen Gewichtes von $d_4 = 1,33$ ergibt sich danach für das Hämovanadin in der Henzelösung ein Molekulargewicht von 24400 ± 1900 .

Tabelle II

Diffusionskoeffizient und Molgewicht von braunrotem Hämovanadin. Henzelösung I: pH = 2,5; 277 γ Vanadium/ml. Henzelösung II: pH = 2,8; 144,5 γ Vanadium/ml.

Probe	Diffusionsdauer <i>t</i> s	ml Ausgangslösung diffundiert <i>Q</i> ml	Diffusionskoeffizient <i>D</i> · 10 ⁷ bei 5°C	Molekelradius <i>r</i> · 10 ⁷ cm	Molekulargewicht <i>M</i>
I	86 400	1,14	7,06	1,88	22 500
	86 400	1,08	6,78	1,96	25 500
	86 400	1,10	6,71	1,98	26 200
II	129 600	1,66	6,85	1,94	24 700
	138 600	1,80	6,95	1,91	23 500
	164 700	2,14	6,93	1,92	23 900

Die Konstanz von Q_{ml} in der Zeiteinheit bei den verschiedenen Versuchen macht es unwahrscheinlich, dass in der Henzelösung mehrere, sich im Molekulargewicht wesentlich unterscheidende, vanadiumhaltige Chromoproteide vorkommen. In Übereinstimmung mit der Empfindlichkeit des Hämovanadins gegen pH-Werte unterhalb 2,5 wurden bei Diffusionsversuchen mit einem schwach angesäuerten Hämolystat (pH = 2,2) Molekulargewichte gefunden, die um etwa eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die oben angegebenen Werte für nicht-denaturiertes, braunrotes Hämovanadin.

Nimmt man an, dass das braunrote Hämovanadin in der Henzelösung denselben Vanadiumgehalt hat wie das aus dieser Lösung mit Azeton gefällte braune Präzipitat, nämlich 4,58 % V, so enthält 1 Molekül braunrotes Hämovanadin etwa 24 Atome Vanadium.

Die Versuche am Hämovanadin wurden von Oktober bis Dezember 1953 an der Zoologischen Station Neapel ausgeführt, der wir ihre grosszügige Unterstützung herzlich danken. Den Aufenthalt in Italien ermöglichte uns eine Zuwendung des Consiglio Nazionale delle Ricerche in Rom. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft förderte die Arbeit durch ein E. BAYER gebotenes Stipendium.

H.-J. BIELIG und E. BAYER

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung,
Institut für Chemie, Heidelberg, den 27. April 1954.

Summary

The red-brown haemovanadin which is contained in the haemolysate (Henze Solution) of blood cells of the ascidia *Phallusia mamillata* Cuvier is a chromoprotein with trivalent vanadium as the central atom and sulphuric acid bound coordinatively. It is found to have a molecular weight of $24,400 \pm 1,900$ according to the estimation of the diffusion coefficient ($D_{5^\circ} = 6.87 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$ cm² · s⁻¹ at pH 2.5–2.8).

Über die Natur des Leberglykogens
normaler und diabetischer Tiere
unter verschiedenen Bedingungen

Die zahlreichen Untersuchungen über den Glykogenstoffwechsel im diabetischen Organismus beschäftigen sich ausschliesslich mit der Menge, nicht aber mit der

Natur des gebildeten Polysaccharids. Die Befunde, die wir bei unseren Untersuchungen über den Gehalt der Leber und des Muskels an Hexosephosphorsäuren beim normalen und diabetischen Tiere erhielten¹, veranlassten uns, diese Frage zu prüfen.

Untersucht wurde die Absorption des Jod-Glykogen-Komplexes in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung nach SCHLAMOWITZ², in halbgesättigter Natriumsulfatlösung und in wässriger Lösung, die Aufspaltungskurve des Glykogens bei der Hydrolyse in *n* HCl sowie die Zahl der Endgruppen nach der Methode von POTTER und HASSID³. Das Glykogen wurde nach den Angaben von SCHLAMOWITZ⁴ isoliert, mit dem Unterschied, dass wir zur Extraktion nicht nur 5%ige, sondern auch 30%ige Trichloressigsäure benützten und dass wir vor der Essigsäurefällung die wasserunlöslichen Stoffe durch Zentrifugieren entfernten. Die Reinheit des Glykogens bestimmten wir durch Reduktion nach 2 ¼ h Hydrolyse in *n* HCl nach HAGEDORN-JENSEN⁵ und nach NELSON⁶, den Phosphatgehalt nach FISKE und SUBARROW⁷. Es wurden hauptsächlich Ratten von 160 bis 200 g Körpergewicht benützt. Die alloxandiabetischen Tiere wurden 15–20 Tage nach der Verabreichung des Alloxans (15 mg/100 g Körpergewicht subkutan) verwendet; die Glukoseausscheidung betrug bei konstanter Nahrungsaufnahme täglich 6,0–8,5 g. Das Leberglykogen wurde nach Fütterung mit gemischter Diät, bei hungernden Tieren (Normaltiere 24 h, diabetische 36 h) nach Zufuhr von Glukose, Fruktose und Sorbose untersucht. Jede Versuchsserie wurde an 3–7 Tieren ausgeführt. Daneben wurde das Leberglykogen nach Glukosefütterung² auch bei einem normalen, 2 kg schweren und bei einem diabetischen Kaninchen untersucht, das 20 Tage vorher intravenös 80 mg/kg Körpergewicht Alloxan erhalten hatte und dessen Blutzucker 550 mg % betrug.

Zunächst haben wir in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung die Jod-Glykogen-Absorptionskurve des Leberglykogens des normalen, mit Glukose gefütterten Kaninchens aufgenommen. Wie aus der Abbildung 1 hervorgeht, erhielten wir denselben Kurvenverlauf wie SCHLAMOWITZ² mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 496 m μ . Das Leberglykogen der Ratte nach Glukosefütterung ergibt unter gleichen Bedingungen annähernd denselben Kurvenverlauf wie dasjenige des Kaninchens (Abb. 1). Das Maximum liegt ebenfalls bei 496 m μ , doch ist die Absorptionsintensität geringer (in halbgesättigtem Natriumsulfat ist die Absorption grösser und die Farbe stabiler als in halbgesättigtem Ammoniumsulfat). Bei den Versuchen mit alloxandiabetischen Ratten unter gleichen Bedingungen sind 2 Feststellungen hervorzuheben: 1. die Absorptionsintensität ist wesentlich geringer als beim Normaltier; 2. es besteht eine Verschiebung des Maximums nach dem kürzeren Wellenbereich (480 m μ , Abb. 1). Dementsprechend ist auch die Farbe des Jod-Glykogen-Komplexes in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung bei alloxandiabetischen Tieren anders als bei normalen, braungelb beim diabetischen, rot beim normalen. Die Untersuchung des Leberglykogens des diabetischen Kaninchens zeigte gleiche Verhältnisse (Abb. 1). Die Unterschiede in Absorption und Farbe zwischen Jod-Glykogen-Komplex

¹ E. DUPASQUIER und L. LASZT (im Druck).
² M. SCHLAMOWITZ, J. biol. Chem. 190, 519 (1951).
³ A. L. POTTER und W. Z. HASSID, J. Amer. Chem. Soc. 70, 3488 (1948).
⁴ M. SCHLAMOWITZ, J. biol. Chem. 188, 145 (1951).
⁵ H. C. HAGEDORN und B. N. JENSEN, Biochem. Z. 135, 46 (1923); 137, 92 (1923).
⁶ N. NELSON, J. biol. Chem. 153, 375 (1944).
⁷ G. H. FISKE und Y. SUBARROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).

der Leber normaler und diabetischer Tiere sind auch in salzfreier, wässriger Lösung vorhanden (Abb. 2). Das Leberglykogen alloxandiabetischer Ratten, die mit Glukose gefüttert und mit Insulin behandelt wurden, zeigt die gleiche Absorptionskurve und die gleichen Farbverhältnisse wie beim Normaltier, jedoch ist die Absorptionsintensität grösser (Abb. 1). Beim mit Insulin behandelten Tier war die Menge des isolierten Glykogens grösser. Es wurde nicht die absolute, sondern nur die isolierte Glykogenmenge gewogen (Tabelle).

Isolierte Menge Glykogen je Leber

Fütterungsart	Normal		Diabetisch	
	Lebergewicht g	Glykogenmenge mg	Lebergewicht g	Glykogenmenge mg
Glukose* . .	5,5 (7)	53,0	6,5 (7)	68,5
Fruktose** .	5,7 (4)	160,0	[5,9 (4)]	187,0
Sorbose*** .	5,85 (3)	26,2	6,1 (3)	31,5

() Zahl der Tiere. * Je 5 cm³ 20%ige Lösung, 3 und 2 h vor der Leberentnahme. [] Behandlung mit Insulin: am 3. und 2. Tag vor dem Versuch 2 × 12 E., 24 h vorher hungern, 4 und 3 h vor der Leberentnahme je 8 E., 3 und 2 h vorher je 5 cm³ 20%ige Glukose-lösung. ** Je 5 cm³ 15%ige Lösung, 5 und 3 h vor der Leberentnahme. *** Je 5 cm³ 10%ige Lösung, 6 und 3 h vor der Leberentnahme.

Nach Fruktosefütterung besteht zwischen normalen und diabetischen Ratten nur noch ein geringer Unterschied in der Absorptionsintensität, die Farbe ist gleich. Die Menge des isolierten Glykogens ist hier grösser als

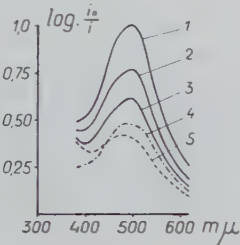


Abb. 1. Absorptionskurve des Jod-Glykogen-Komplexes der Leber von mit Glukose gefütterten Tieren, in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung. 1 Kaninchen, normal; 2 Ratte, diabetisch, mit Insulin behandelt; 3 Ratte, normal; 4 Kaninchen, diabetisch; 5 Ratte, diabetisch. Alle Messungen sind mit dem Beckmann-Photometer (1-cm³-Küvette) unter Berücksichtigung der Lichtstreuung des Glykogens und der Absorption der verwendeten Jodlösung aufgenommen worden.

nach Glukosefütterung. Dieses unterschiedliche Verhalten des Glykogens, je nachdem, ob Glukose oder Fruktose verfüttert wurde, kann nicht etwa auf die langsamere Resorption der Fruktose zurückgeführt werden, da nach Verabreichung von Sorbose, die bekanntlich noch wesentlich langsamer resorbiert wird, die gleichen Verhältnisse wie nach Glukosefütterung zu beobachten sind. Es wäre falsch, anzunehmen, dass der Fruktosestoffwechsel insulinunabhängig ist. Es wird nämlich auch die zugeführte Fruktose beim diabetischen Tier zum Teil unverändert und zum Teil in Form von Glukose ausgeschieden.

Es stellte sich nun die Frage, ob in der Leber diabetischer Tiere verschiedene Polysaccharide, darunter auch normales Glykogen, gebildet werden. Wir haben versucht, das isolierte Polysaccharid in mehrere Fraktionen

zu zerlegen durch stufenweise Fällung mit gesättigter wässriger Ammoniumsulfatlösung (g.A.S.-Lösung). Dabei fanden wir, dass nach Zusatz der 6fachen Menge g.A.S.-Lösung zu der Polysaccharidlösung, die aus der Leber normaler oder diabetischer Tiere gewonnen ist, sofort eine Fällung entsteht. Der durch Abzentrifugierung isolierte Niederschlag ist in Wasser löslich. Zentrifugiert man hingegen den Niederschlag erst nach 12–14 h ab, so zeigt sich ein wesentlicher Unterschied.

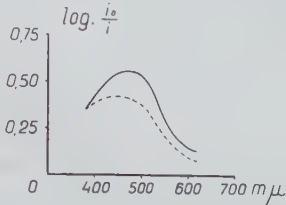


Abb. 2. Absorptionskurve des Jod-Glykogen-Komplexes der Leber von mit Glukose gefütterten Ratten, in salzfreier, wässriger Lösung (3 cm³ 0,5%ige Glykogen- + 0,1 cm³ Jodlösung: 0,125% Jod, 0,25% Kaliumjodid). Ausgezogene Linie: normal. Gestrichelte Linie: diabetisch.

Das Polysaccharid von normalen Tieren ist in Wasser und in *n* HCl bei Zimmertemperatur unlöslich, wohl aber beim Erwärmen. Dagegen löst sich das Polysaccharid von diabetischen Tieren auch in der Kälte glatt in Wasser. Mit gesättigtem Natriumsulfat bleibt diese Reaktion aus. Um Anhaltspunkte über den Zusammenhang zwischen der Struktur des Polysaccharids und der erwähnten Reaktion zu erhalten, haben wir die gleichen Versuche auch mit Amylose und Amylopectin (Kartoffel¹) durchgeführt. Beide Stoffe verhalten sich wie Normalglykogen. Zur Fraktionierung gingen wir von 4 cm³ einer 2,5%igen Lösung des Polysaccharids aus, die mit 3½ Volumen g.A.S.-Lösung versetzt und nach 5' Stehen während 10' zentrifugiert wurden. Die über-

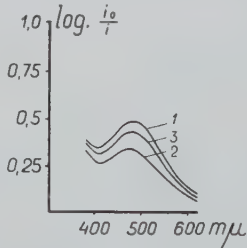


Abb. 3. Absorptionskurven des Jod-Polysaccharid-Komplexes der verschiedenen Fraktionen in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung. 1 Fraktion 1; 2 Fraktion 2; 3 Totalgemisch.

stehende Flüssigkeit wurde mit 2½ Volumen und schliesslich mit dem dreifachen Volumen g.A.s.-Lösung versetzt und jeweils zentrifugiert. Mit dem 3½-fachen Volumen g.A.S.-Lösung ergab sich für das Polysaccharid des diabetischen Tieres eine erste Fraktion, mit dem sechsfachen eine zweite und mit dem neunfachen (letzte in 2 von 4 Versuchen) eine dritte. Beim Normaltier erhielten wir nur eine Fällung nach Versetzen mit dem 3½-fachen Volumen. Die einzelnen Fällungen wurden auf die gleiche Weise wie die Glykogenrohextrakte gereinigt (Eliminierung des Fällungsmittels). Dass es sich hier um verschiedene Polysaccharide handelt, geht aus der Verschiedenheit der Absorptionsintensität der Jod-Komplexe (Abb. 3) sowie der Aufspaltungsgeschwindig-

¹ Ich danke dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Genf für die freundliche Überlassung dieser Produkte.

keit der Polysaccharide hervor. Es sei hier besonders auf die rasche Aufspaltung des aus der Leber diabetischer Ratten isolierten Polysaccharids hingewiesen. Dieses ist bereits nach etwa 60–65' (nach Vorbehandlung mit Insulin 135') aufgespalten, Fraktion 3 nach 35', Fraktion 1 nach 75' (Abb. 4).

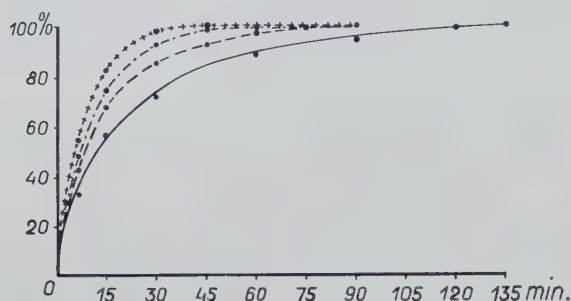


Abb. 4. Aufspaltungskurven der verschiedenen Polysaccharidfraktionen der Leber nach Hydrolyse in n HCl (10 mg Polysaccharid in 10 cm³ Wasser gelöst + 10 cm³ 2 n HCl). Diabetische, mit Glukose gefütterte Ratte: ---- erste Fraktion; - - - - - zweite Fraktion; + + + + + dritte Fraktion. Diabetische, mit Insulin behandelte, mit Glukose gefütterte Ratte: —————.

Die Endgruppenzahlbestimmungen haben merkwürdigerweise sowohl beim normalen als beim diabetischen Glykogen den gleichen Wert ergeben (normal: 19,8, diabetisch: 19,3). Zu dieser Untersuchung wurden je 10 mit Glukose gefütterte, normale und diabetische Ratten verwendet. Die Perjodatoxydation erfolgte in 100-mg-Portionen und als Endwert wurden 25 h gewählt.

Die Versuche zeigen, dass in der Leber diabetischer Tiere andere, und zwar labilere Polysaccharide gebildet werden als bei normalen Tieren. Es werden weitere Untersuchungen über die Natur der im Muskel normaler und diabetischer Tiere vorhandenen Polysaccharide sowie über deren enzymatische Spaltung durchgeführt.

L. LASZT

Physiologisches Institut der Universität Fribourg, den 17. April 1954.

Summary

In the liver of diabetic animals, other and more labile polysaccharids are formed than in that of normal animals.

The iodine absorption, the speed of breakdown and the reaction with saturated ammonium sulfate of the polysaccharids isolated from the liver are different in the diabetic animal from those in the normal one.

The stepwise precipitation with ammonium sulfate of the polysaccharide isolated from the liver yielded 3 fractions in the diabetic animal whereas there was only one in the normal animal.

Veränderungen in der Mitochondrienfraktion der Rattenleber nach Total- und Leberfeldbestrahlung (1000 r)

Der Mechanismus der Strahlenwirkung auf den lebenden Organismus ist noch in vielfacher Beziehung unklar. Bekannt sind vor allem die Schädigungen des Zellkerns, welcher Röntgenstrahlen gegenüber besonders empfindlich ist. Das komplexe klinische Bild, das nach Strahleneinwirkungen auftritt, lässt eine Vielzahl von Störungen namentlich auch im Bereiche des Zellplasmas vermuten. Über eine Herabsetzung der oxydativen Phos-

phorylierung in den Milzmitochondrien bestrahlter Tiere ist kürzlich von verschiedenen Autoren berichtet worden¹. Im Gegensatz dazu sind Wirkungen auf die relativ strahlenresistente Leber weniger bekannt, obgleich dieses Organ im Intermediärstoffwechsel eine zentrale Stellung einnimmt. Es wurde daher das Verhalten von Mitochondrien aus der Leber normaler und bestrahlter Ratten untersucht.

Ratten beiderlei Geschlechts von 200 bis 300 g Körpergewicht wurden folgendermassen behandelt: 1. Leberfeldbestrahlung (3 × 2 cm) a) mit Betatron (Serie I) 1000 rl, 31 MeV, b) mit üblicher Röntgenbestrahlung (Serie II) 1000 rl, 200 kV, 15 mA, Cu 0,5, HWS_{Cu} 0,83, FA 40 cm. 2. Allgemeinbestrahlung (Serie III), 1000 rl, 250 kV, 15 mA, Th I, HWS_{Cu} 1,52, FA 50 cm. Töten der Tiere 1–3 Tage (Allgemeinbestrahlung) bzw. 1–10 Tage (Leberfeldbestrahlung) nach Strahleneinwirkung. Es wurden bestimmt: a) Das relative Lebergewicht und der Wassergehalt des Lebergewebes. b) Die Aktivität der Succinodehydrase im Totalhomogenat nach SCHNEIDER und POTTER² als Beispiel eines einzelnen am Kohlenhydratabbau beteiligten Ferments. c) die Pyruvatoxydation und die Mitochondrienschwellung nach RAAFLAUB³ bzw. AEBI und ABELIN⁴. Zur Pyruvatoxydation bedarf es der morphologischen und funktionellen Intaktheit der Mitochondrien, da dieser Oxydationsvorgang auf der Zusammenarbeit einer ganzen Reihe von Fermenten (Enzymkomplex der Zyklophorase) beruht. Andererseits ist die Unterdrückung der ausgeprägten Schwellungstendenz der isolierten Mitochondrien an die Bildung (Resynthese) einer genügenden Menge von ATP gebunden. Die Schwellung der Mitochondrien kann auf photometrischem Wege als Extinktionsabfall erfasst werden. Beide Verfahren geben somit indirekt Aufschluss über das Funktionieren der oxydativen Phosphorylierung. Die angewandten Methoden sind beschrieben (siehe ⁵).

Die Resultate sind in der Tabelle wiedergegeben. Es ergibt sich folgender Befund: Während die Aktivität der Succinodehydrase von der Bestrahlung in keiner Weise beeinflusst wird, lassen sowohl die verminderte Pyruvatoxydation als auch der erhöhte Schwellungsgrad der Mitochondrien (Extinktionsabnahme der Mitochondriensuspension) auf eine Störung der oxydativen Phosphorylierung von allerdings geringem Ausmass schliessen.

Dieser fundamentale Prozess der Energieumwandlung erleidet somit nicht nur in der Milz, sondern auch in der eher strahlenresistenten Leber eine *in vitro* fassbare Schädigung. Da es sich hier anscheinend um eine generell auftretende Stoffwechselstörung handelt, ist zu vermuten, dass ihr bei der Genese des Strahlenschadens eine Bedeutung zukommt. Schliesslich ist folgender Befund von Interesse: Obwohl die Totalbestrahlung innerhalb von 4 Tagen stets zum Tode führte, die Lokalbestrahlung im Gegensatz dazu sich in keinem einzigen Fall letal auswirkte, hatten beide Bestrahlungsverfahren qualitativ und quantitativ die gleichen biochemischen Veränderungen zur Folge. Es darf daher angenommen

¹ R. L. POTTER und F. H. BETHELL, Federation Proc. 11, 270 (1952). – E. MAXWELL und G. ASHWELL, Arch. Biochem. 43, 389 (1953). – D. W. VAN BEKKUM, H. J. JONGEPIER, H. T. M. NIEUWERKERK und J. A. COHEN, Transactions Faraday Soc. 49, 363 (1953), Brit. J. Radiol. 27, 127 (1954).

² W. C. SCHNEIDER und V. R. POTTER, J. Biol. Chem. 149, 217 (1943).

³ J. RAAFLAUB, Helv. physiol. Acta 11, 142 (1953).

⁴ H. AEBI und I. ABELIN, Biochem. Z. 324, 364 (1953).

⁵ H. AEBI und I. ABELIN, Biochem. Z. 324, 364 (1953).

	Leberfeldbestrahlung (Serie I–II)			Totalbestrahlung (Serie III)		
	Kontrolle (12 Tiere)	Test (12 Tiere)	Relative Abwei- chung von der Norm	Kontrolle (6 Tiere)	Test (6 Tiere)	Relative Abwei- chung v. d. Norm
Relatives Lebergewicht (100 × Lebergewicht/Körpergewicht)	3,35 ± 0,11	3,67 ± 0,09*	+10%	3,21 ± 0,09	3,52 ± 0,21	+10%
Wassergehalt der Leber (%)	70,0 ± 0,3	69,8 ± 0,3	–	69,6 ± 0,4	70,1 ± 0,3	–
Grösse der Mitochondrienfraktion (totaler N- Gehalt der Fraktion in % desjenigen des Ge- samtgewebes)	28,1 ± 1,1	27,7 ± 1,6	–	29,3 ± 1,4	29,3 ± 1,5	–
Succinodehydase-Aktivität (mm ³ O ₂ /h/mg N des Totalhomogenats)	729,0 ± 51,1	731,3 ± 46,2	0	722,0 ± 36,9	726,8 ± 38,3	0
Pyruvatoxydation (mm ³ O ₂ /h/mg N der Mitochondriensuspension). Extinktion der 1:50 verdünnten Mitochondrien- suspension (Mannit isoton.)	187,6 ± 6,4 0,589 ± 0,018	165,9 ± 5,7 0,572 ± 0,014	–12% –	182,6 ± 8,0 0,588 ± 0,006	163,3 ± 4,9 0,555 ± 0,033	–11% –

* Statistische Auswertung von Serie I–II: Die beim relativen Lebergewicht und der Pyruvatoxydation auftretenden Abweichungen von der Norm sind im *t*-Test nach STUDENT als signifikant befunden worden (*p* 0,05). Angegeben sind jeweiligen Durchschnitt und mittlerer Fehler des Mittelwertes. Bei der Analyse des vorliegenden Versuchsmaterials lassen sich zunächst keine gesicherten Unterschiede zwischen Bestrahlung durch Betatron (Serie I) und Röntgenröhre (Serie II) erkennen. Eine Abhängigkeit der beobachteten Bestrahlungseffekte von der Zeit ist innerhalb des geprüften Bereiches nicht nachweisbar.

werden, dass die hier im Bereich des Leberstoffwechsels beobachteten Störungen für den letalen Ausgang bei der Totalbestrahlung allein für sich nicht wesentlich sind, dass sie indessen als Ausdruck eines direkten Strahlungsschadens bewertet werden müssen.

H. RYSER, H. AEBI und A. ZUPPINGER

Röntgeninstitut und Medizinisch-Chemisches Institut
der Universität Bern, den 8. Februar 1954.

Summary

A study was made of the influence of local (liver field) and total irradiation (1,000 rl) on the enzymatic activity of isolated liver mitochondria from adult rats. While the succinodehydrogenase activity remains unaltered, the oxydation of pyruvate—as well as the structural stability of the mitochondria—are found to be reduced, entailing a decrease in the oxydative phosphorylation. These variations remain the same even after total or local irradiation.

Inhibition sélective de quelques enzymes
respiratoires chez *Escherichia coli*

Dans un mémoire précédent¹, nous avons montré que grâce à un procédé physique d'inhibition: la pression, il était possible de dissocier des fonctions physiologiques d'un microbe telles que son pouvoir de prolifération, sa respiration, éventuellement sa mobilité. Des pressions qui abaissent, par exemple, considérablement les facultés de prolifération du microbe laissent persister une activité respiratoire notable.

Dans le cas des enzymes de la respiration, nous avons recherché les pressions limites qui entraînent l'inhibition totale ou quasi totale des enzymes oxydatifs de diacides: acides succinique, fumarique, malique et oxalacétique et de monoacides: acides pyruvique et acétique. Notre matériel expérimental était *Escherichia coli*, souche Monod.

¹ P. VIGNAIS, M. MACHEBOEUF et J. BASSET, J. Chim. Phys. (1953) (sous presse).

Signalons que JOHNSON et EYRING¹ ont recherché comment évoluait sous de faibles pressions une réaction enzymatique (luciférase-luciférine) chez des bactéries luminescentes. Notre étude est différente: les bactéries à l'état non proliférant sont soumises en absence de substrat à de hautes pressions pendant un temps très court puis ramenées à la pression atmosphérique; on recherche alors les altérations subies par divers systèmes enzymatiques.

Protocole expérimental. L'étude des activités enzymatiques s'effectue sur des bactéries à l'état non proliférant. La culture qui sert à la préparation de ces bactéries est obtenue de la façon suivante: Un inoculum bactérien provenant d'une gélose nutritive sert à ensementer 10 ml d'eau peptonée. Après quelques heures (8 à 10 h) de prolifération à 37°C, on prélève deux gouttes pour ensementer 50 ml de milieu nutritif (un litre de ce milieu contient: 10 g de peptone VAILLANT, 5 g de phosphate bipotassique, 100 ml d'extrait de levure SPRINGER; le pH est ajusté à 7). Un inoculum de 5% en volume provenant de la dernière subculture est ajouté à 300 ml de milieu nutritif contenus dans une fiole de FERNBACH de 2 l de capacité. La culture est agitée sur une machine à secousses à 37°C; la prolifération s'opère ainsi dans des conditions d'aération optimum. De plus, les repiquages successifs assurent une population homogène. Au bout de 5 h, les bactéries sont recueillies par centrifugation à 2500 t./min. Les suspensions obtenues après 2 lavages successifs à l'eau bidistillée suivis de centrifugation renferment 8 à 10 mg de bactéries (poids sec) par millilitre.

Sur ces bactéries à l'état non proliférant on étudie l'action inhibitrice de la pression. La technique utilisée a été exposée dans un mémoire antérieur². La suspension microbienne est introduite dans des sacs de caoutchouc «para pur» et soumise pendant 5 min à des pressions qui s'échelonnent entre 1600 et 3600 kg/cm². La température à l'intérieur des presses est stabilisée à 37°C. Les montées en pression et les décompressions s'effectuent

¹ F. H. JOHNSON, H. EYRING, R. STEBLAY, H. CHAPLIN, C. HUBER et G. GHERARDI, J. Gen. Phys. 28, 463 (1945). – F. H. JOHNSON et H. EYRING, Ann. N. Y. Acad. Sci. 49, 376 (1948).

² P. VIGNAIS, E. BARBU, M. MACHEBOEUF et J. BASSET, Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 43 (1952).

lentement; leur durée est de l'ordre d'une minute par 1000 kg/cm².

A leur sortie de presse on étudie le métabolisme oxydatif des bactéries vis-à-vis des différents substrats: sel de sodium des acides acétique, pyruvique, oxalacétique, succinique, fumarique et malique. Les solutions de ces différents sels sont préparés extemporanément. Pour chaque substrat la consommation d'oxygène est mesurée par la méthode manométrique de WARBURG, sa valeur est obtenue après déduction de la respiration endogène. Chaque fiole de l'appareil de WARBURG contient:

- dans la cupule: 1 ml de suspension microbienne, 0,1 ml de tampon phosphate M/15 de pH 7,2;
 - dans le diverticule latéral: éventuellement 0,2 ml de solution M/20 du substrat (soit 10 μM);
 - dans le godet central: 0,2 ml de lessive de potasse à 20 %.
- On ajuste à 2 ml avec de l'eau bidistillée.

Résultats expérimentaux

1° Pressions limites d'inhibition complète. Nous avons recherché les pressions qui déterminent chez les bactéries une inhibition presque totale de leur activité oxydative vis-à-vis des différents substrats énumérés plus haut.

Nous avons choisi comme norme une inhibition supérieure à 90 % après un contact de 100 min à 37°C avec 10 μM de substrat. (Nous avons constaté qu'au delà de ce temps, l'oxydation n'évolue pratiquement plus.)

Le tableau suivant montre que le seuil des pressions qui entraînent cette inactivation limite est bien différent pour chaque substrat.

Tableau I

Substrat	Pressions entraînant une inactivation supérieure à 90 %
Acétate	1900 kg/cm ² (5 min)
Pyruvate	2200 kg/cm ² (5 min)
Oxalacétate	2200 kg/cm ² (5 min)
Malate ou fumarate. . . .	2800 kg/cm ² (5 min)
Succinate*	3600 kg/cm ² (5 min)

* Dans le cas du succinate le seuil d'inhibition n'est pas net: pour 2500 kg/cm² l'inhibition est de 87 %; elle ne dépasse 90 % qu'à partir de 3600 kg/cm².

Lorsque des bactéries sont soumises à des pressions inférieures aux pressions limites d'inhibition complète, elles conservent une activité oxydative partielle. Ainsi, une pression d'une certaine valeur peut entraîner pour un système enzymatique une inhibition totale ou sub-totale et pour d'autres une inhibition partielle; par exemple, des suspensions bactériennes qui ont été comprimées à 2200 kg/cm² n'oxydent plus l'acétate de sodium, ni le pyruvate, ni l'oxalacétate alors qu'elles métabolisent encore notablement le malate, le fumarate, le succinate.

Grâce à un procédé physique d'inhibition, il devient donc possible de bloquer à un stade quelconque les réactions d'une chaîne métabolique.

2° Pressions d'inhibition partielle. En étudiant pour chaque système enzymatique l'influence de pressions de valeurs différentes, on peut se faire une idée de l'évolution de l'inhibition en fonction de la pression. L'inhibition partielle porte:

- sur la vitesse d'oxydation du substrat;
- sur la quantité totale de substrat oxydé;

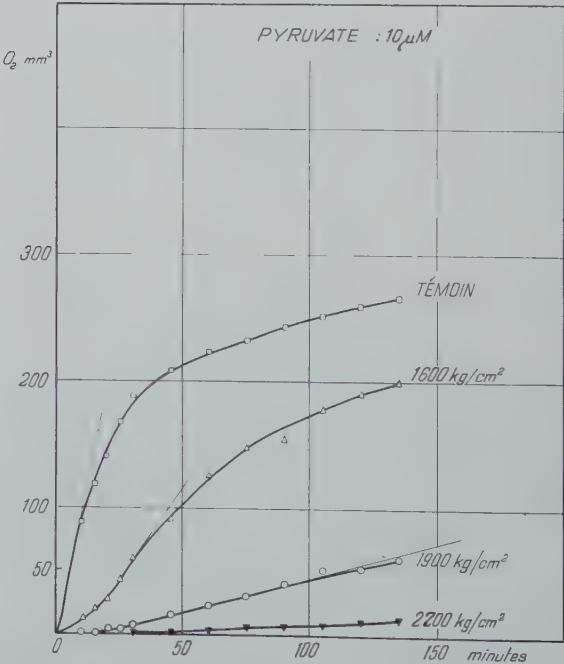
sur l'aptitude de l'enzyme à oxyder immédiatement le substrat.

a) Vitesse d'oxydation. Les vitesses d'oxydation se calculent facilement d'après la pente des courbes de consommation d'oxygène – la pente est mesurée dans la région de la courbe où la vitesse d'oxydation est maximum. Mais il arrive que chez les bactéries endommagées par la pression, l'activité résiduelle n'apparaisse qu'après un certain temps de contact avec le substrat; dans ce cas on tient compte de la partie de la courbe qui suit le temps de latence. Les figures 1 à 5 illustrent l'action plus ou moins inhibante des différentes pressions sur les vitesses d'oxydation enzymatique. Dans le tableau II nous avons noté les pourcentages d'inhibition: $P_t - P_p / P_t \times 100$ où P_t et P_p représentent respectivement les pentes des courbes d'oxydation pour les bactéries témoins et pressées.

Tableau II

	1600 kg/cm ²	1900 kg/cm ²	2200 kg/cm ²	2500 kg/cm ²	3100 kg/cm ²
	%	%	%	%	%
Acétate	77	95	97		
Pyruvate	73	93	98		
Oxalacétate	36	84	96		
Fumarate	30	58	73		
Succinate		50		66	83

b) Quantité totale de substrat oxydé. Des bactéries qui ont été soumises à une certaine pression peuvent conserver la faculté d'oxyder la même quantité de substrat que le témoin (fumarate: témoin et 1600 kg/cm²). Mais souvent l'oxydation d'un substrat par des bactéries «pressées» tend vers une limite qui reste notablement inférieure à celle des témoins.

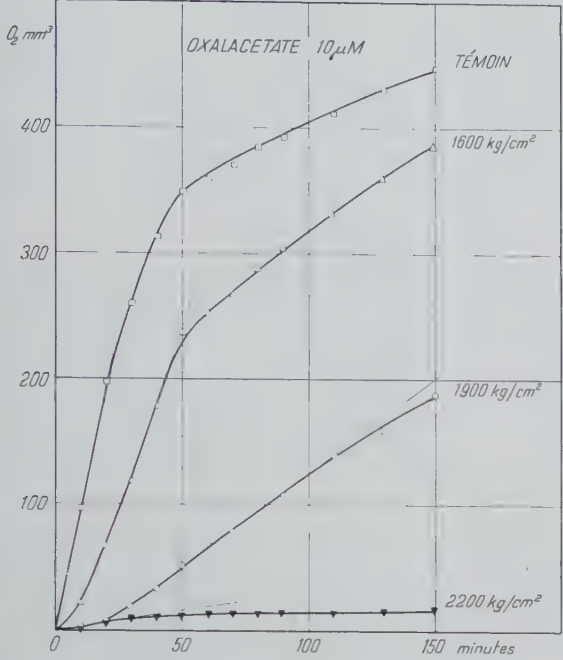


D'autre part, bien que les inhibitions portant sur les vitesses d'oxydation et sur les quantités de substrat oxydé augmentent avec la pression, il n'existe pas de corrélation très stricte entre ces 2 processus.

c) Aptitude de l'enzyme à oxyder immédiatement le substrat. Certains systèmes enzymatiques de bactéries «pressées» oxydent leur substrat dès que les bactéries sont

prises à son contact. D'autres présentent une inhibition totale pendant les premiers instants et ne métabolisent le substrat qu'après un temps de latence de plusieurs minutes. Ainsi, des bactéries comprimées à 1900 kg/cm²

substrat n'évoluant pas au delà d'une limite bien définie. On peut penser que pour les substrats étudiés (mono- et diacides) qui constituent une chaîne métabolique normale chez *E. coli*, l'inhibition totale portant sur l'oxy-



puis mises au contact du pyruvate n'oxydent ce dernier qu'après 15 min; le même phénomène a été mis en évidence dans le cas de l'oxalacétate et de l'acétate.

Discussion. 1° Les seuils de pression qui entraînent une inhibition complète rendent compte d'un effet global sur les systèmes enzymatiques d'*Escherichia coli*; dans le

dation d'un métabolite retentit sur l'oxydation des autres de façon partielle mais irréversible.

3° Plusieurs interprétations peuvent être données pour expliquer le temps de latence qui précède parfois la reprise d'activité enzymatique.

—La pression aurait une action dénaturante partiellement réversible sur la «structure secondaire» des protéines enzymatiques. La reprise d'activité correspondrait au réarrangement de cette structure et à la reconstitution des molécules sous leur forme native.

—Il est possible également que des bactéries possédant une quantité d'enzyme suffisante pour métaboliser un substrat peuvent néanmoins au contact de ce substrat synthétiser de nouvelles molécules d'enzyme. Cette «néogénèse» pourrait s'effectuer à partir de précurseurs présents dans la cellule bactérienne. Elle est normalement masquée par l'activité de l'enzyme constitutif, mais pourrait apparaître si ce dernier était inhibé.

—Enfin, il n'est pas impossible que la bactérie endommagée puisse utiliser après un certain temps d'adaptation une voie accessoire de métabolisme lorsque la voie normale se trouve coupée.

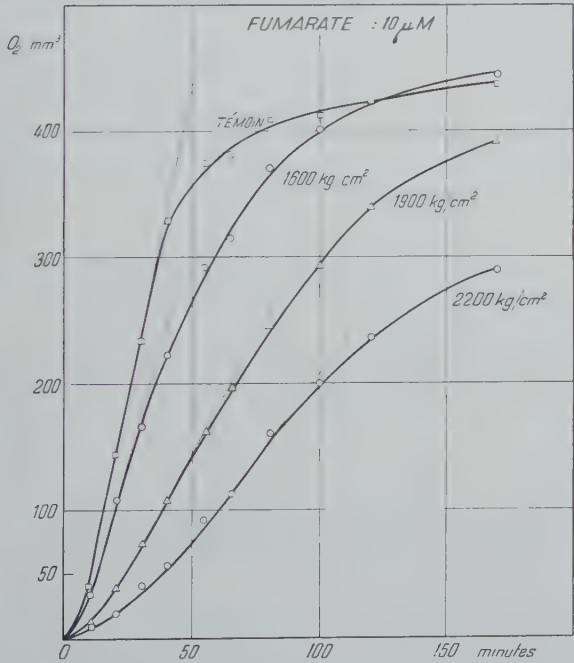
Nous tenons à remercier J. BASSET qui a mis ses presses à notre disposition et G. J. LEPESQUEUR qui effectua de nombreuses mises en pression.

PAULETTE VIGNAIS et P. VIGNAIS

Service de Chimie biologique, Institut Pasteur, Paris, le 30 novembre 1953.

Summary

It is possible to dissociate the activity of different enzymatic systems of the bacterium *Escherichia coli* by the action of high hydrostatic pressures. This activity is studied in the microbes after having been subjected to high hydrostatic pressure. Each enzymatic system is inhibited at different pressures. The enzymes of the bacteria submitted to pressures lower than the inhibiting limit show a residual enzymatic activity; sometimes this activity appears after a phase of lag.



cas où l'oxydation d'un substrat donné met en jeu simultanément plusieurs systèmes enzymatiques l'inhibition totale porte sur l'ensemble de ces systèmes.

2° Certaines pressions provoquent des inhibitions partielles mais cependant irréversibles, l'oxydation du

Spectrophotometric Method for Estimating Enzymatic Synthesis of Butyl Oleate

RAMAKRISHNAN and NEVGI¹ prepared an acetone powder from castor seed which affected 39% synthesis of butyl oleate in five days. HOFSTEE² has recently worked out an assay system to estimate esterase spectrophotometrically using Salicylate ester as substrate. The author has worked out a similar assay system to estimate the synthesis of butyl oleate spectrophotometrically.

Experimental. Acetone-dried lipase powder was prepared from castor seed according to RAMAKRISHNAN and NEVGI's method¹ and used for the experiments. N-butyl alcohol, oleic acid and petroleum ether (B.P. 40–60°) were used. The absorption was studied in a BECKMAN spectrophotometer. The results of the various experiments are given in the following Tables.

Table I

The reaction mixture consisted of castor lipase: 0.1 g; N. Butyl alcohol: 0.005 M; oleic acid: 0.005 M; petr. ether: to make up the vol. to 3 cm³; incubation for 2 h at 37°C

Set No.	Wave lengths mμ	Absorbance
1	390	0.075
2	395	0.085
3	400	0.092
4	405	0.092
5	410	0.090
6	415	0.070
7	420	0.065
8	430	0.062
9	440	0.055
10	450	0.045
11	500	0.014
12	540	0.009

In all the experiments, petroleum ether, alcohol and enzyme blanks had negligible absorptions. The absorbance was proportional to the concentration of ester.

Table II

The reaction mixture consisted of castor lipase 0.2 g, different amounts of alcohol and acid and petroleum ether to make up the volume to 3 cm³, incubated for 2 h at 37°C and read at 400 mμ against blank containing all except the enzyme

Set No.	Concentration of alcohol (M)	Concentration of oleic acid (M)	Absorption	% Synthesis
1	0.001	0.005	0.037	2.4
2	0.002	0.005	0.073	4.8
3	0.005	0.005	0.184	12.0
4	0.008	0.005	0.184	12.0
5	0.005	0.001	0.038	2.4
6	0.005	0.002	0.070	4.6
7	0.005	0.008	0.182	11.9

From the above results, it can be seen that butyl oleate shows an absorbance at 400–405 and it is pro-

Table III

The reaction mixture consisted of 0.005 M alcohol and acid, and different amounts of enzyme and petroleum ether added to make up the volume to 3 cm³ incubated for 2 h at 37°C and read against blank at 400 mμ

Set No	Concentration of enzyme	Absorption	% Synthesis
1	0.1	0.092	6.0
2	0.2	0.184	12.0
3	0.3	0.180	11.7

Table IV

The reaction mixture consisted of 0.2 g of castor lipase, 0.005 M each of alcohol and acid, and petroleum ether added to make up the volume to 3 cm³, incubated for different amounts of time and read against blank at 400 mμ

Set No.	Incubation time h	Absorption	% Synthesis
1	1/2	0.100	6.5
2	1	0.152	9.9
3	1-1/2	0.178	11.6
4	2	0.184	12.0
5	2-1/2	0.184	12.0
6	3	0.182	11.9

portional to the concentration of ester. Mixture consisted of 0.005 M acid and alcohol, 0.2 g of lipase and petroleum ether to make up the volume to 3 cm³ and incubated for 2 h at 37°C gives 12% butyl oleate synthesis. This method seems to be a very simple and handy one and similar assay systems can be constructed for estimating the synthesis of different esters.

Acknowledgement. The author wishes to thank Dr. D. M. BOSE, the Director and Dr. J. K. CHOWDHARY, the Head of the Chemistry Department, for the keen interest they have shown throughout the progress of the problem.

C. V. RAMAKRISHNAN¹

Bose Institute, Calcutta, India, November 20, 1953.

Zusammenfassung

Es wird eine einfache spektrophotometrische Methode für die Bestimmung der enzymatischen Synthese von Butyloleat beschrieben.

¹ Present address: Division of Applied Biology, National Research Council, Ottawa, Canada.

Enzymatic Conversion of Testosterone to Androstenedione by Human Serum

Recent studies on the *in vitro* metabolism of testosterone by human tissues have shown that active metabolism of this steroid is carried on by a variety of normal and malignant human tissues¹. These tissues include target-organs (prostate) as well as non-target-organs.

¹ C. V. RAMAKRISHNAN and G. V. NEVGI, J. Ind. Chem. Soc. 27, 6, 260–261 (1950).

² B. H. J. HOFSTEE, J. biol. Chem. 1952, 357.

¹ H. M. LEMON, H. H. WOTIZ, and T. ROBITSCHER, J. clin. Endocrinol. Metabolism 13, 948 (1953). — H. H. WOTIZ, H. M. LEMON, and A. VOULGARPOULOS, J. biol. Chem. (in press).

It was felt that the enzyme system responsible for this oxidation might leak into the serum similar to such enzymes as prostatic acid phosphatase and β -glucuronidase.

The methods used in this study were essentially the same as those described by WOTIZ and LEMON¹. Each incubation mixture contained 20 cm³ of KREBS-RINGER phosphate buffer at pH 7.3, 1 cm³ of serum, 2 mg of testosterone and 1 mg DPN. The incubation was carried out for 3 h at 38°C. Recoveries from control experiments obtained by boiling the serum or by incubation at pH 9 are shown in Table I.

Table I

Exp. No.	Inhibition	mg Testosterone added	mg Testosterone recovered	% Recovery
1	Serum boiled . . .	2	1.8	90
2	Serum boiled . . .	1	1.0	100
3	Incubation at pH 9	1	1.0	100
4	Incubation at pH 9	1	1.0	100

In Table II the results obtained from incubation of six sera from different healthy subjects are listed. As can be seen, all of the sera actively metabolized testosterone at approximately the same rate. One half of each total extract was applied to a paper-chromatogram and developed in a ligroin-propylene glycol system². In each case two new ketosteroids were found on staining with the ZIMMERMANN reagent, except for the control experiments, which showed no steroid other than starting material at any time. One of the new products gave a purple color and was identified as androstenedione by mixed paper chromatography and infra-red absorption spectra. The other compound, giving a purple ZIMMERMANN color, occupied a position intermediary to testosterone and androstenedione.

Table II

Exp. No.	mg Testosterone added	mg Testosterone recovered	% Testosterone metabolized
1	2	0.88	56
2	2	0.84	58
3	2	0.89	57
4	2	1.22	39
5	2	1.03	49
6	2	0.90	55

These findings should serve as a caution to clinical and scientific investigators utilizing serum or serum fractions to solubilize steroids. This method is sometimes applied for infusion of steroids into living animals or is used in the study of the metabolism of steroids by perfusion of isolated glands. The possibility that other androgens, as well as corticoids and estrogens, may be similarly affected must be taken into consideration and is now being investigated in this laboratory. Possible qualitative and quantitative changes in this reaction

in cases of disease, especially cancer, are also under investigation utilizing 4-C¹⁴-testosterone.

R. RICHTERICH-VAN BAERLE, H. H. WOTIZ, and H. M. LEMON

Departments of Medicine and Biochemistry, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts, U.S.A., March 9, 1954.

Zusammenfassung

Durch *in-vitro*-Experimente konnte gezeigt werden, dass im menschlichen Serum ein Enzymsystem vorhanden ist, das Testosteron abzubauen vermag. Als Endprodukte wurden Androstendion sowie weitere bisher noch nicht identifizierte Steroide nachgewiesen.

On the Nature of Some Smooth Muscle Active Substances from the Platelets

Several smooth muscle active substances from the platelets have been described in recent years. Evidence that active substances found in serum by several authors¹ came from the platelets had been given first by FREUND², STEWART and ZUCKER³, and lately by REID and coworkers⁴.

Recently RAPPORT, GREEN, and PAGE⁵ isolated from beef serum, as a creatinine sulfate complex, a crystalline vasoconstrictor substance, serotoninine, identified as 5-hydroxytryptamine. REID admitted that the substance extracted from platelets, previously described by him as thrombocytin, can be identified with 5-hydroxytryptamine⁶. Serotonin can also be liberated from the platelets by antigen-antibody reaction *in vitro* as have been shown by HUMPHREY and JACQUES⁷.

We showed in a previous paper⁸ that horse anti-platelet serum liberated from washed horse platelets, *in vitro*, an active substance, contracting the guinea-pig ileum, inducing hypotension on atropinized rabbits, and not identified with histamine, acetylcholine, kalikrein, substance P, tyramine, adenilic acid, bradykinin, or potassium ions.

The purpose of the present paper was to establish the inter-relationship between the substance liberated from the platelets by the anti-platelet serum and two others: smooth muscle contracting fraction⁹ and serotonin, both found in the platelets. The stability of the smooth muscle contracting fraction at alkaline pH indicate that it can not be identified with the substance liberated from the platelets by anti-platelet serum (thrombocytolysine). Differences with serotonin could now be established using three kinds of experiments:

¹ C. LUDWIG and A. SCHMIDT, Quoted by T. C. JANEWAY, H. B. RICHARDSON and A. PARK, Arch. Internal. Med. 21, 565 (1918). – L. T. STEVENS and F. S. LEE, Johns Hopkins Biol. Studies 3, 99 (1884), quoted by G. REID and M. BICK,
² H. FREUND, Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 86, 266 (1920).
³ STEWART and T. F. ZUCKER, J. Exper. Med. 17, 152 (1913).
⁴ G. REID and M. BICK, Austral. J. Exper. Biol. Med. Sci. 20, 33 (1942).
⁵ M. M. RAPPORT, A. A. GREEN, and I. H. PAGE, J. Biol. Chem. 176, 1243 (1948).
⁶ G. REID and M. RAND, Nature 169, 801 (1952).
⁷ J. H. HUMPHREY and R. JACQUES, J. Physiol. 119, 43P (1953).
⁸ H. MOUSSATCHÉ and W. O. CRUZ, Arch. int. Pharmac. 91, 224 (1952).
⁹ M. B. ZUCKER, Amer. J. Physiol. 142, 12 (1944).

¹ H. H. WOTIZ and H. M. LEMON, J. biol. Chem. 206, 525 (1954).
² K. SAVARD, J. biol. Chem. 202, 457 (1953).

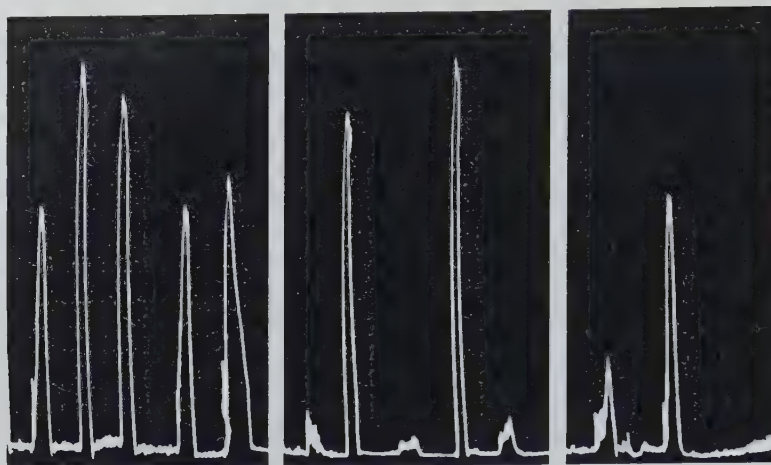


Fig. 1.—Guinea-pig ileum in 10 ml Tyrode. *S* 0.3 ml serotonin creatine sulfate 2×10^{-5} ; *H* 0.5 ml histamine dihydrochloride 10^{-6} ; *Trb* 0.3 ml Thrombocytolysine 10^{-3} ; *Trpt* 0.8 ml Tryptamine hydrochloride 10^{-3} . When tryptamine was added to the bath, serotonin was specifically inhibited; contractility recovered 40 min after.

(1) GADDUM¹ showed that large dose of tryptamine applied to perfused guinea-pig ileum desensitizes the gut to 5-hydroxytryptamine, although the organ still responds normally to other drugs.

In our experiments (Fig. 1), moderate contractions of the guinea-pig ileum could be induced by 5-hydroxytryptamine² (*S*), histamine (*H*), thrombocytolysine (*Trb*) and tryptamine (*Trpt*)³. When a high dose of tryptamine is added to the bath, a good contraction occurred, relaxation being complete some minutes after, and then the preparation becomes desensitized to 5-hydroxytryptamine for more than 20 min, while contractions by histamine and thrombocytolysine are normal. 40 min after contractility the serotonin has been restored.

Using serotonin ROCHA and SILVA and coworkers⁴ showed that a high dose of this substance inhibited the

guinea-pig ileum for the smaller one. Adding a high dose of serotonin to the bath perfusing the gut, we could inhibit the contractions previously obtained with smaller doses of serotonin, while returning those obtained with thrombocytolysine and histamine.

(2) SHEPHERD, WEST, and ERSFAMER¹ showed that serotonin and tryptamine give a golden-yellow and bright-yellow fluorescence respectively under ultra-violet light when treated with solutions containing nine parts of 0.1% of potassium dichromate and one part of formaldehyde solution (37–41%).

This test has been applied to thrombocytolysine, no fluorescence being evidenced by 100 μ g, using "spot test" on filter paper, while it appeared clearly using a few μ g of serotonin and tryptamine. Hopkins-Cole reaction has also been assayed on thrombocytolysine with negative results.

(3) A third type of evidence against the serotonin nature of thrombocytolysine has been obtained using the specific inhibitory action of yohimbine and ergotamine on serotonin. It has been shown by several authors that yohimbine and ergotamine can inhibit some of the pharmacological actions of serotonin. Recently WOOLEY

¹ J. H. GADDUM, J. Physiol. 119, 363 (1953).

² I am indebted to Dr. R. K. RICHARDS, from the Abbotts Laboratories, for the sample of serotonin creatinine sulfate supplied by Hoffmann-La Roche S.A.

³ Tryptamin hydrochloride was kindly supplied by "Hoffmann-La Roche" S.A.

⁴ M. ROCHA, SILVA, J. R. VALLE, and Z. PICARELLI, IV Annual Meeting Brazilian Soc. Advanc. Sci., Résumé in Ciencia e Cultura 4, 130 (1952).

¹ D. M. SHEPHERD, G. B. WEST, and V. ERSFAMER, Nature 172, 357 (1953).

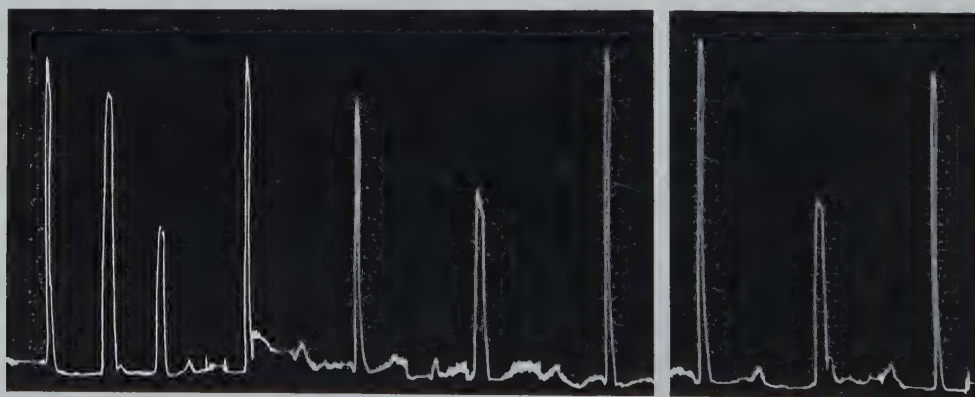


Fig. 2.—Influence of ergotamine on serotonin and thrombocytolysine contraction. Guinea-pig ileum, in 10 ml Tyrode. *H* 0.05 ml histamine dihydrocl. 10^{-6} ; *S* 0.2 μ g/ml serotonin creatine sulfate; *Trb* 0.3 ml thrombocytolysine 10^{-3} ; *E* 0.25 μ g/ml, ergotamine tartarate.

and col.¹ showed the competitive nature of this type of inhibition using segments of sheep carotid artery. Similar results have been obtained on guinea-pig ileum². The experiment of Figure 2 has been made using ergotamine as inhibitory substance. It represents the inhibitory effect of ergotamine on contractions with serotonin, while contractions with histamine and thrombocytolsine are present.

From all these experiments it can be deduced that thrombocytolsine, a substance liberated from the platelets by the anti-platelet serum is not identical with 5-hydroxytryptamine.

H. MOUSSATCHÉ

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, January 4, 1954.

Zusammenfassung

In einer früheren Arbeit wurde das Thrombozytolysin beschrieben, eine Substanz, die aus Pferde-Thrombozyten nach Einwirkung des homologen Thrombozyten-antikörpers freigesetzt wird. Die in dieser Arbeit berichteten experimentellen Resultate berechtigen zur Schlussfolgerung, dass das Thrombozytolysin mit Serotonin (5-hydroxytryptamin) nicht identisch ist.

¹ E. SHAW and D. W. WOOLLEY, *J. Biol. Chem.* **203**, 979 (1953).
² H. MOUSSATCHÉ, unpublished results.

Non-Specificity of the Effect of Cardiac Glycosides on the Polymerization of Actin

A few years ago HORVÁTH, KIRÁLY, and SZERB¹ reported that the polymerization of actin from heart muscle is promoted by cardiac glycosides. This finding was confirmed in this laboratory by SNELLMAN and GELOTTE². In view of the selectivity of action of the cardiac glycosides on the heart the further observation of HORVÁTH *et al.*¹ that these drugs had no effect on actin from skeletal muscle seemed of particular interest. The existence of differences in the reaction of preparations of cardiac and of skeletal muscle actin to steroid substances was again brought to the fore in recent experiments with cortisone³.

The action of the cardiac glycosides *in vivo*, besides being largely confined to the heart, is specific in a second respect in that it is strictly dependent upon certain distinctive structural features of the active molecules. Slight structural modifications may suffice to bring about complete or partial inactivation. As has been emphasized before⁴, it seems reasonable to expect the correlation between chemical structure and cardiac activity to hold for any effect of these drugs *in vitro* having a bearing on their action on the living heart muscle fiber. The experiments reported below indicate that the enhancing effect on the polymerization of actin does not fall into this category.

G-actin was obtained from calf heart muscle by the method of FEUER, MOLNÁR, PETTKÓ, and STRAUB⁵. For polymerization 0.25 volumes of a salt solution were added to the aqueous extract of the acetone-dried heart powder containing the protein. The composition of the salt solution was as follows: 0.5 M KCl, 0.01 M MgCl₂, 0.1 M potassium phosphate of pH 7.0. Polymerization

was measured viscosimetrically. The following steroid glycosides, which had previously been tested by us in the heart-lung preparation of the dog, were used: The cardio-active emicymarin and its cardio-inactive isomer alloemicymarin, which differs from the active compound in the spatial configuration of the substituents at carbon 17; and the cardio-active scillaren A and its cardio-inactive derivative hexahydroscillaren A. The latter possesses a saturated lactone ring and has no nuclear double bond. The glycosides were added to the actin solutions immediately before addition of the salt as 0.2% solutions in methanol. In the amounts added the alcohol itself had no significant effect on the actin in the presence of salt.

The results of an experiment in which the final concentration of glycoside was 20 µg per ml are presented in the Table. It is seen that the cardio-inactive compounds increased the viscosity of the salt-treated acetone powder extract to the same extent as did the cardio-active compounds. None of the compounds had a significant effect at concentrations below 5 µg per ml.

Extracts of acetone heart powder usually contain variable amounts of tropomyosin. This protein is polymerized in water and depolymerizes on addition of salt, with a resulting decrease in the viscosity of its solutions¹. The glycosides had no appreciable influence on the depolymerization of tropomyosin in the concentrations used in this study. The high viscosities of the glycoside-containing solutions in the experiment shown in the Table can, therefore, be attributed to increased polymerization of actin.

Table

Effect of Cardio-Active and Cardio-Inactive Steroidal Glycosides on the Polymerization of Actin from Heart Muscle.

Final concentration of protein 3.0 mg/ml. Final concentration of glycosides 20 µg/ml. Viscosity measured at 22°C, 30 min after addition of salt.

Addition to acetone powder extract	η spec.
0.25 vol. water	0.303
0.25 vol. water + 0.0125 vol. methanol	0.313
0.25 vol. salt soln.	0.370
0.25 vol. salt soln. + 0.0125 vol. methanol	0.365
0.25 vol. salt soln. + 0.0125 vol. methanol + emicymarin	0.468
0.25 vol. salt soln. + 0.0125 vol. methanol + alloemicymarin	0.469
0.25 vol. salt soln. + 0.0125 vol. methanol + scillaren A	0.467
0.25 vol. salt soln. + 0.0125 vol. methanol + hexahydroscillaren A	0.463

SNELLMAN and GELOTTE² have reported that in aqueous extracts of acetone heart powder they found what appeared to be an ATP or adenylic deaminase, subject to inhibition by cardio-active glycosides. We have been unable to determine whether such inhibition might also be produced by cardio-inactive glycosides because the actin-containing extracts tested for this purpose were free of such deaminase activity.

Not all actin preparations showed increased polymerization on addition of steroid glycosides. Results such as those presented in the Table were obtained with actin from hearts which had remained in the body for some time after death. When actin was prepared from calf

¹ I. HORVÁTH, C. KIRÁLY, and J. SZERB, *Nature* **164**, 792 (1949).
² O. SNELLMAN and B. GELOTTE, *Nature* **165**, 604 (1950).
³ J. B. COWLE and R. H. THORP, *Nature* **171**, 1067 (1953).
⁴ A. WOLLENBERGER, *Pharmacol. Reviews* **1**, 311 (1949).
⁵ G. FEUER, F. MOLNÁR, E. PETTKÓ, and F. B. STRAUB, *Hungarica physiol. acta* **1**, 150 (1948).
¹ K. BAILEY, *Biochem. J.* **43**, 27 (1948).
² O. SNELLMAN and B. GELOTTE, *Nature* **165**, 604 (1950).

hearts which had been excised immediately after stunning the animal and had been placed in ice-cold water while still beating vigorously, addition of salt caused a sharp rise in viscosity, comparable in magnitude to the increase customarily obtained with actin from fresh skeletal muscle. In these instances the steroid glycosides were without effect.

Following the discovery by HORVÁTH *et al.*¹ of the influence of cardiac glycosides on the polymerization of actin a variety of other effects of these drugs on contractile muscle proteins were described in the literature. Whether some of these effects are likewise unspecific in the sense that they can be reproduced by structural analogs devoid of cardiac activity is at present under investigation.

This work was undertaken during tenure of a Life Insurance Medical Research Fellowship. I wish to express my gratitude to Prof. T. REICHSTEIN for a generous gift of emicymarin and alloemicymarin, and to Prof. A. STOLL for a generous gift of scillaren A and hexahydroscillaren A. I am also grateful to Dr. O. SNELLMAN and Dr. B. GELOTTE for their interest and cooperation.

A. WOLLENBERGER²

Institute of Biochemistry, University of Uppsala, March 3, 1954.

Zusammenfassung

Die fördernde Wirkung der herzwirksamen Glykoside Emizymarin und Szillaren A auf die Polymerisation von Aktin aus Herzmuskel wird in demselben Masse von den strukturell nahe verwandten, jedoch herzunwirksamen Glykosiden Alloemizymarin und Hexahydrozillaren A ausgeübt.

¹ I. HORVÁTH, C. KIRÁLY, and J. SZERB, *Nature* 164, 792 (1949).

² Present address: Pharmakologisches Institut der Humboldt-Universität, Berlin NW 7.

Sull'ossidazione dell'acido lattico ed acido piruvico e di alcuni componenti del ciclo citrico in omogenati di epitelio corneale

Le ricerche sulla partecipazione del ciclo citrico di KREBS nell'ossidazione dell'acido piruvico da parte di tessuti oculari sono scarse. In due mie note¹ ho riferito sull'attività deidrogenasica generale della cornea, cristallino e retina mediante il Trifenil-tetrazolio, e sulla localizzazione istochimica della succinodeidrogenasi col Blu Tetrazolio. I miei dati hanno permesso di poter localizzare l'attività deidrogenasica elettivamente nell'epitelio corneale ed in minima parte nell'endotelio. Nella presente nota riferisco i risultati delle mie ricerche sulle deidrogenasi del ciclo citrico di KREBS in omogenati di epitelio corneale bovino mediante il Trifenil Tetrazolio.

Per le mie ricerche ho adoperato la tecnica consigliata da NORDMAN e NORDMAN². L'epitelio di cornee bovine veniva scarificato e si preparava un omogenato al 20% nell'omogenizzatore in vetro di POTTER³; per la determinazione dell'attività deidrogenasica la miscela d'incubazione era preparata nelle seguenti proporzioni: In tubi da centrifuga si aggiungevano 1 ml di omogenato al 20% (200 mg), 0,5 ml Puffer Fosfati (0,1 M) pH 7,4, 0,5 ml di substrato (0,2 M) (acido lattico, piruvico) (acido citrico, α -chetoglutarico, succinico, malico) 1 ml di Trifenil Tetrazolio (0,1%) si completava a 4 ml con

acqua distillata previa aggiunta di 0,3 ml di ATP (0,01 M).

I tubi da saggio si lasciavano incubare a 37°C per 30' agitando due tre volte durante l'incubazione, si aggiungevano successivamente 10 ml di acetone, si agitava e si centrifugava.

Il liquido soprastante veniva decantato e si leggeva l'estinzione in colorimetro KLETT con filtro 420. In ogni prova si praticavano due controlli uno senza substrato ed il secondo anche senza substrato ma con aggiunta di una determinata quantità di Tetrazolio. Nella Tabella riporto la media dei dati di più esperimenti, l'attività enzimatica è riferita in μ g di Tetrazolio ridotto in 30' da 1 mg di tessuto (peso fresco).

Deidrogenazione dell'Acido Lattico, Piruvico e di alcuni componenti del ciclo citrico in omogenati di epitelio corneale

Substrati	N. Esp.	μ g Tetrazolio rid. da 1 mg di tess. 30'	Errore Standard
Acido lattico.	12	0,10	$\pm 0,04$
Acido piruvico	9	0,22	$\pm 0,05$
Acido citrico	15	0,63	$\pm 0,12$
Acido chetoglutarico	10	0,24	$\pm 0,08$
Acido succinico	8	0,78	$\pm 0,10$
Acido malico	14	0,12	$\pm 0,03$

L'esame della tabella mostra che in presenza di tutti gli acidi del ciclo citrico saggati è stato possibile mettere in evidenza nell'epitelio corneale una notevole attività deidrogenasica, e pertanto si può ammettere che anche nel tessuto corneale come in tutti i tessuti il ciclo tricarbossilico abbia un'importanza fondamentale nei processi ossidativi.

Addendum. Mentre la presente nota era in corso di pubblicazione, ho potuto prendere visione di alcuni lavori di JAEGER¹ sullo stesso argomento. L'Autore adoperando lo stesso metodo, ha ottenuto risultati che concordano con i miei dati.

E. DE BERARDINIS

Istituto di Clinica Oculistica Università Napoli, il 10 novembre 1953.

Summary

Dehydrogenase Activity of some components of citric cycle in corneal Epithelium homogenates is determined by means of 2-3-5 Triphenyltetrazoliumchloride.

¹ W. JAEGER, *Graefes Archiv. Ophthalmol.* 154, 142, 401, 431 (1953).

Cortical Representation of the Cortico-Motoneuronal System in Monkeys

Functional evidence has recently been presented by BERNHARD, BOHM, and PETERSÉN¹ and by BERNHARD and BOHM² for a direct activation of the spinal motoneurons by descending volleys in corticospinal fibres in the monkey. That fraction of the corticospinal system, the descending volley in which activates the spinal motoneurons directly, i.e. monosynaptically, we refer to as the cortico-motoneuronal system or the CM system. We have now attacked the problem concerning the topography of the cortical representation of the CM system for different muscles.

¹ C. G. BERNHARD, E. BOHM, and I. PETERSÉN, *Exper.* 9, 111 (1953); *Acta physiol. Scand.* 29, suppl. 106, 79 (1953).

² C. G. BERNHARD and E. BOHM, *Acta physiol. Scand.* In press (1954).

¹ E. DE BERARDINIS, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* 27, 7 (1951); 29, 63 (1953).

² I. NORDMAN, R. NORDMAN, O. GAUCHERY, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33, 1826 (1951).

³ V. R. POTTER, *I. Biol. Chem.* 114, 495 (1936).

Single and repetitive square wave shocks of short duration (0.5–1 ms) were used for stimulation of the cortex in narcotized, curarized monkeys (*Macaca mulatta*) and the action potentials were led off from different peripheral nerves in the fore limb. The effect of cortical stimulation on the monosynaptic ventral root reflex in the lumbar region was also studied.

Figure 1 shows the shape of the electrical response in the triceps nerve to contralateral cortical stimulation within the fore limb subdivision at a frequency of 25 per s. The pictures (A–F) taken at various intervals after the beginning of the repetitive stimulation, show a series of superimposed records of the action potentials following upon each cortical stimulus. During the first two seconds of repetitive stimulation (Fig. 1 A–B) an early response appeared, the amplitude of which increased to a maximum (B). Later on the early response decreased and disappeared (Fig. 1 C) in order to appear and fall again (Fig. 1 D–F). These fluctuations of the amplitude are typical for the early response when it is led off from nerves or ventral roots innervating fore and hind limb muscles.

In different types of experiments it was shown that the early response, which in this experiment had a latency of 3.4 ms represents activity in motoneurons which are monosynaptically activated by descending volleys in the corticospinal neurones¹. According to our earlier investigations, this cortico-motoneuronal system, the CM system, comprises the corticospinal fibres with highest conduction rate, i.e. about 70 M per s corresponding to the diameter values around 12–14 μ given by HÄGGQVIST² and LASSEK³.

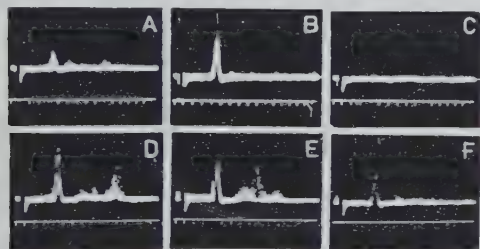


Fig. 1.—Superimposed action potentials in the left triceps nerve following each stimulus in a train of shocks (stimulation frequency 25 per s) delivered to the fore limb subdivision of the right precentral area. A–F, records obtained 1(A), 2(B), 3(C), 8(D), 9(E), and 10(F) s after the beginning of the repetitive stimulation. Time in ms.

The phasic amplitude variations of the monosynaptic triceps nerve response to cortical stimulation with six different stimulation frequencies, obtained in a similar experiment, are illustrated graphically in Figure 2. The amplitude values of the monosynaptic triceps response are plotted against time from the beginning of the repetitive stimulation. The diagrams show that the latency of the building up of the first phase shortens from about 8 s (at 13 per s) to 1 s (at 25 per s) in order to increase again at a higher stimulation frequency (35 per s). In parallel to this regular shift in the delay of the first phase there is a regular variation of the amplitude of the first phase. As seen the shortest latency of the first phase, as well as the highest amplitude of the monosyn-

aptic response during this phase, was obtained at frequencies around 25 per s.

Since thus, stimulation frequencies of 20–25 per s were found to be most effective for the building up of the monosynaptic response, these frequencies were used in the following mapping experiments.

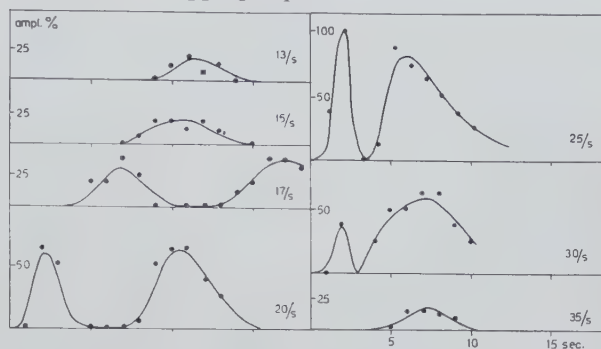


Fig. 2.—Amplitude values of the monosynaptic response in the triceps nerve to contralateral cortical stimulation with different frequencies (13, 15, 17, 20, 25, 30, and 35 per s) plotted against time from the beginning of the repetitive cortical stimulation. The amplitude values are given in per cent of the highest value obtained (100 per cent in curve 25/s).

Experiments were performed in which the action potentials were led off from the *triceps* nerve when different points within the precentral cortical area were stimulated. Figure 3 shows the surface of the precentral cortical area from a typical experiment and the different points numbered, indicate the different sites on the cortical surface on which the stimulating electrode was placed. Curves similar to that in Figure 2 (25/s) were drawn on the basis of the results obtained when different points (1–19 in Figure 3) were stimulated. The latencies of the first phase of the different curves were then measured. It was found that the monosynaptic triceps response to stimulation of point 5 appeared within 1 s after the beginning of the repetitive stimulation. This point is included within the circle drawn in full on the map in Figure 3 (the 1 s “latency field”). The field surrounded by a dashed line includes the points the stimulation of which elicited a monosynaptic triceps nerve response within 3 s after the beginning of the repetitive stimulation (the 3 s “latency field”). When the surrounding cortical areas were stimulated the monosynaptic response appeared still later during the course of stimulation. Thus, when taking into account the rapidity with which the response is built up by repetitive cortical stimulation, the most effective field for elicitation of the monosynaptic response in the triceps nerve is marked by the inner circle drawn in full. It was also found that the largest monosynaptic responses were elicited from the area the stimulation of which was also followed by a rapid building up of the monosynaptic response.

As seen in Figure 1 (A, D, and E) there are also one or several late responses. The late responses may be built up in parallel to, earlier, or later than the monosynaptic response during the course of the repetitive stimulation. In Figure 1 the amplitude of the late responses also fluctuates during the course of the repetitive stimulation, and these fluctuations may also show one or two phases. It was found that the late responses could be elicited from a wider area than the monosynaptic response. A comparison of the characteristics of the monosynaptic response and those of the late responses thus shows that the cortical representation of the direct cortico-motoneuronal system for one muscle is more

¹ C. G. BERNHARD, E. BOHM, and I. PETERSÉN, *Exper.* 9, 111 (1953); *Acta physiol. Scand.* 29, suppl. 106, 79 (1953). — C. G. BERNHARD and E. BOHM, *Acta physiol. Scand.*, in press (1954).

² G. HÄGGQVIST, *Acta psychiat. neurol.* 12, 457 (1937).

³ A. M. LASSEK, *J. comp. neurol.* 79, 407 (1943).

restricted than that of the system which is responsible for the late responses.

The cortical representation of the CM system for the *biceps nerve* was also mapped using the same experimental procedure as in the triceps experiments. The lower circles in Figure 3 show the representation of the CM system for the biceps nerve. As seen there is a restricted field where stimulation was followed by a monosynaptic biceps response which was built up within 1 s after the beginning of the repetitive stimulation (the 1 s "latency field"; circle drawn in full). The two surrounding circles mark the 2 and 3 s "latency fields".

In a classical investigation SHERRINGTON and HERING¹ described excitation and inhibition of limb antagonists to cortical stimulation. The effect may however be due to—or partly due to—afferent back responses from the muscles during the contraction.

In special series of experiments we found that there is a reciprocal behaviour of the monosynaptic responses in the nerves to the two antagonistic muscles. Stimulation of the lower part of the "triceps field" was found to counteract the monosynaptic biceps response elicited from the upper part of the "biceps field" and *vice versa*. Since the preparations were curarized there were no

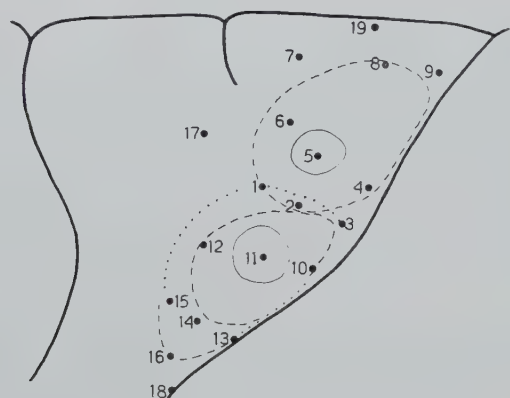


Fig. 3.—Map of the precentral area and orientation of the different points (1–19) stimulated in the experiments described in the text in which monosynaptic responses were recorded from the contralateral triceps and biceps nerves (stimulation frequency 25 per s). Upper set of circles indicate the triceps fields (circle drawn in full, 1 s "latency field"; dashed circle, 2 s "latency field"; dotted circle, 3 s "latency field"). Lower set of circles indicate the biceps fields (circle drawn in full, 1 s "latency field"; dashed circle, 2 s "latency field"; dotted circle, 3 s "latency field"). For further explanation see text.

muscle contractions. Thus the reciprocal behaviour of the responses described was not due to afferent back responses from the muscles.

Experiments similar to those described above were performed in which the responses to contralateral cortical stimulation were led off from the *thenar* and *hypothenar* nerves. There is a striking difference between the responses obtained from the thenar and hypothenar nerves and those recorded from the triceps and biceps nerves. The record of the thenar nerve responses were always characterized by a poverty in late discharges whereas the biceps and triceps responses to each single stimulus consisted of a whole set of action potentials following upon the monosynaptic response.

Since the value, representing the synaptic delay between corticospinal neurones and the thenar or hypothenar motoneurons, was also found to be of the

same magnitude as that found for monosynaptic transmission elsewhere, we concluded¹ that the thenar nerve motoneurons are also monosynaptically activated by descending volleys in the corticospinal fibres.

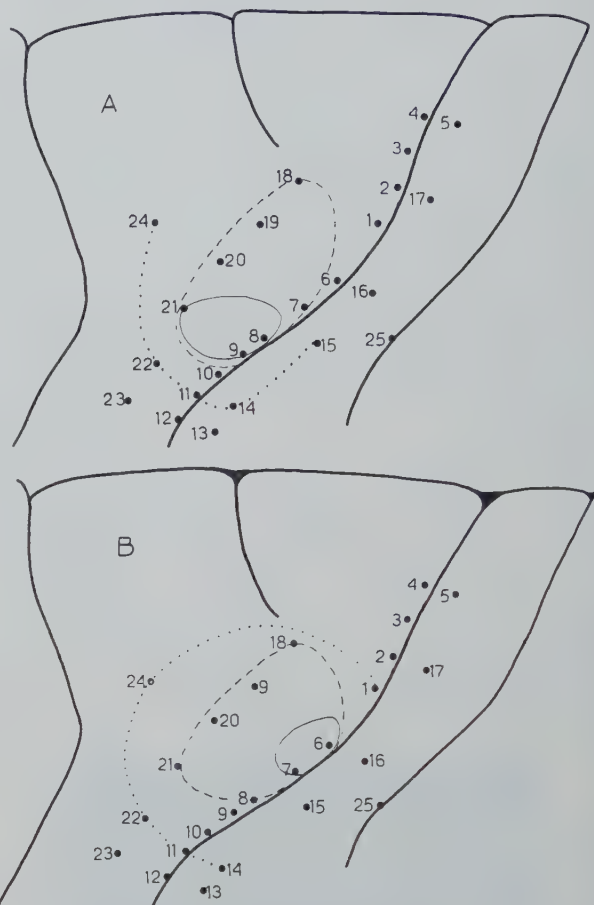


Fig. 4.—A. Map of the precentral area and orientation of the different points (1–25) stimulated in the experiment described in the text in which the monosynaptic responses were recorded from the contralateral thenar nerve (stimulation frequency 25 per s). Circle drawn in full, 2 s "latency field". Dashed circle, 4 s "latency field". Dotted line, anterior border of the 6 s "latency field". B. Same as in Figure 4A for the monosynaptic hypothenar nerve response. Circle drawn in full, 2 s "latency field". Dashed circle, 4 s "latency field". Dotted line, anterior border of the 6 s "latency field".

The solid circle (in Fig. 4A) shows the field the stimulation of which was followed by a monosynaptic thenar nerve response, which began to rise within 3 s after the beginning of the repetitive stimulation. The dashed circle indicates the 5 s "latency field" and the dotted line the lower border of the 8 s "latency field". Thus the circle drawn in full marks the most potent field for the elicitation of the monosynaptic thenar nerve response. The monosynaptic response of the hypothenar nerve was recorded in the same experiment and Figure 4B shows the results of the mapping of the CM system for the hypothenar nerve. The three different circles indicate the 2, 4, and 6 s "latency fields". In this preparation the most potent field for the elicitation of monosynaptic hypothenar nerve responses was situated above that of the thenar nerve. In other similar experiments we found that these two fields may overlap.

¹ C. S. SHERRINGTON and H. E. HERING, Proc. Roy. Soc. 62B, 1183 (1897).

¹ C. G. BERNHARD and E. BOHM, Arch. Neurol. Psychiat., Chicago 1954 (in press).

Records were also made of the responses in different nerves *ipsilateral* to the cortical region stimulated. The experiments showed that the CM systems for the nerves to the proximal arm muscles also have an ipsilateral cortical representation, whereas they indicate that this is not the case for the CM systems activating the nerves to the distal hand muscles in which only contralateral monosynaptic responses to cortical stimulation could be recorded.

In the investigations made by previous authors on the analysis of the corticospinal system in monkeys (see e.g. review by RUCH¹), the movements or muscle contractions resulting from cortical stimulation were recorded. In our experiments the responses in different peripheral nerves to single cortical stimuli, as well as to each stimulus in a train of cortical shocks, were recorded. A single cortical shock elicits a descending volley in the fast conducting corticospinal neurones of the pyramidal tract². In our experiments we found that single cortical shocks do not elicit any monosynaptic responses in the different fore limb nerves tested. Repetitive stimulation had to be used and during the course of stimulation the monosynaptic responses were built up in a regular way. It was shown that the repetitive cortical stimulation builds up a "tonic" asynchronous discharge and a long-lasting facilitatory action which successively raises the excitability of motoneurones; and further, that when the facilitatory action reaches a certain level, the monosynaptic responses to the descending volleys in the fast conducting CM fibres break through. In a series of experiments in which the conditioning effect of repetitive cortical stimulation on the monosynaptic reflex was tested, it was found that the cortical field, from which the facilitation of a certain group of spinal motoneurones was elicited, not only covered the restricted cortical field representing the CM system which activates the same group of motoneurones, but also exceeded it. It is of great interest to note that "the facilitatory area" and "the CM area" for the same group of spinal motoneurones have the same posterior border towards the postcentral gyrus, whereas the "facilitatory area" extends in the anterior direction (see BERNHARD and BOHM³).

C. G. BERNHARD and E. BOHM

Physiological Department II, Karolinska Institutet, Stockholm, April 21, 1954.

Zusammenfassung

Es wurden Aktionspotentiale verschiedener Nerven registriert, welche auf jede kortikale Reizung in einem Zuge von repetitiven Stimulationen folgten, ferner wurden monosynaptische Reflexe nach konditionierenden kortikalen Stimulationen geprüft.

Die Experimente ergaben, dass unter den verschiedenen kortikospinalen Systemen das direkte kortikomotoneuronale System (das CM-System) die am meisten abgegrenzte kortikale Repräsentation besitzt.

¹ T. C. RUCH, *Handbook of Experimental Psychology*, chapt. 5, p. 154 (1951).

² C. G. BERNHARD, E. BOHM, and I. PETERSÉN, *Acta physiol. Scand.* 29, suppl. 106, 79 (1953).

³ C. G. BERNHARD and E. BOHM, *Acta neurol. Psychiat.*, Chicago 1954 (in press).

PRO EXPERIMENTIS

Die Isolierung eosinophiler Leukozyten und ihrer Granula

Frühere Versuche zur Gewinnung eosinophiler Zellen und Granula beruhten auf chemischen Methoden. WEISS¹ beschrieb schon 1891 die Resistenz der Granula gegen Fermentlösungen. Die Reindarstellung eosinophiler Granula aus Pferdeblut gelang PETRY² 1908 mittels Trypsin. NEUMANN³ isolierte die Granula später unter Verwendung anderer lytischer Prozesse (NaOH, Autolyse) und stellte mit der gewonnenen Reinsubstanz umfangreiche physikalisch-chemische Untersuchungen an. In neuer Zeit hat VERCAUTEREN⁴ eosinophile Granula auf rein physikalischem Weg dargestellt, indem er die Gesamtleukozyten in einem Homogenisatorapparat zerkleinerte und die freien Granula durch wiederholtes fraktioniertes Zentrifugieren gewann.

Eine von BEHRENS und TAUBERT⁵ entwickelte Technik erlaubt nun erstmals, die einzelnen Leukozytenarten des Blutes auf Grund des spezifischen Gewichtes voneinander zu trennen. Es gelingt damit, aus Pferdeblut eine Suspension eosinophiler Granulozyten herzustellen. Somit steht uns ein sehr zweckmässiges Ausgangsmaterial zur relativ ergiebigen Gewinnung der eosinophilen Granula zur Verfügung. Wir verwenden folgende Arbeitsmethode:

1. *Isolierung eosinophiler Granulozyten.* Leukozyten werden gewaschen, entwässert und nach dem spezifischen Gewicht getrennt. Als Ausgangsmaterial dient Pferdeblut, das steril aus der Halsvene entnommen wird und durchschnittlich 3–5% Eosinophile enthält. 200 cm³ 3,5%ige Na-Zitrat-Lösung werden mit 800 cm³ Blut bei der Entnahme gut gemischt und in einer Standflasche stehengelassen, bis sich die Erythrozyten auf halbe Höhe der Flüssigkeitssäule gesenkt haben. Die erforderliche Zeit beträgt je nach Senkungsgeschwindigkeit des Blutes ½–2 h. Dann wird das überstehende, deutlich rotgefärbte Plasma abgehebert. Es enthält neben Leukozyten noch massenhaft Erythrozyten. Die gewonnene Plasmamenge von etwa 500 cm³ wird in Portionen zu 100–150 cm³ 4 min lang bei einer Tourenzahl von 1700/min zentrifugiert (Zentrifuge Stock, Marburg). Das Sediment wird vereinigt und in 30 cm³ 1%iger NaCl-Lösung aufgeschüttelt. Durch die etwas hypertonsche Salzlösung kommt es zu einer leichten Schrumpfung der Erythrozyten und der neutrophilen Granulozyten, während die eosinophilen Zellen ihr Volumen kaum verändern. Bei den Eosinophilen des Pferdes handelt es sich ohnehin um relativ grosse Zellen, und der Unterschied in der Zellgrösse lässt sich so noch akzentuieren.

Die Zellen werden wiederum während 4 min bei einer Tourenzahl von 1700/min zu Boden zentrifugiert. Das Sediment wird zehnmal gewaschen, jedesmal in 30 cm³ 1%iger NaCl-Lösung kräftig aufgeschüttelt und kurz zentrifugiert (2½ min bei 1700 T.). Dadurch lässt sich nicht nur das Plasmaeiweiss weitgehend eliminieren,

¹ A. WEISS, *Zbl. med. Wiss.* 29, 881 (1891).

² E. PETRY, *Wien. klin. Wschr.* 21, 1360 (1908); *Biochem. Z.* 18, 92 (1912).

³ A. NEUMANN, *Biochem. Z.* 148, 524 (1924); 150, 256 (1924); *Fol. haematolog.* 36, 95 (1928); *Hdb. allg. Haematol.* 1, 354 (1932, Urban & Schwarzenberg).

⁴ R. VERCAUTEREN, *Enzymologia* 16, 1 (1953).

⁵ M. BEHRENS und M. TAUBERT, *Hoppe Seyler Z. physiol. Chem.* 289, 63 (1952); 290, 228 (1953).

sondern es werden mit der Waschflüssigkeit auch die im Sediment noch vorhandenen Erythrozyten und ein Teil der Leukozyten entfernt. Das anfänglich rote Sediment wird weiss und besteht schliesslich fast nur noch aus Granulozyten, wobei auch die Eosinophilen bereits deutlich angereichert sind. Nach dem Waschen werden die Zellen entwässert. Das Sediment wird in 50 cm³ 1%iger NaCl-Lösung aufgeschwemmt, unter kräftigem Umschütteln mit 250 cm³ Azeton versetzt und etwa 1 h stehengelassen. Nach erneutem Zentrifugieren (2 min 1700 T.) werden die Zellen einmal in 30 cm³ 95%igem Azeton (95 T. Azeton, 5 T. Aqua dest.) und viermal in 30 cm³ reinem Azeton gewaschen. Das Sediment ist jetzt entwässert; die Zellen sind aber grösstenteils miteinander verklumpt.

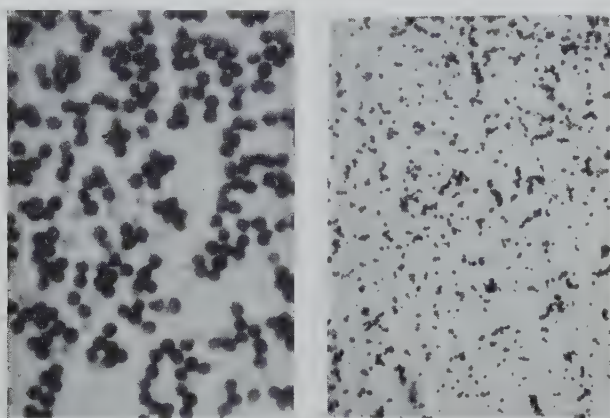


Abb. 1 (links). Zellanreicherung aus Pferdeblut. Schwarze Zellen = Eosinophile (Ausstrichpräparat, Färbung May-Grünwald, Vergrösserung 560 $\times$). — Abb. 2 (rechts). Eosinophile Granula des Pferdes (Ausstrichpräparat, Färbung May-Grünwald, Vergrösserung 560 $\times$).

Das Leukozytensediment wird mit 10 cm³ Tetrachlorkohlenstoff und 3 g pulverisiertem, wasserfreiem Na₂SO₄ versetzt und in einer Schüttelmaschine so lange und so intensiv geschüttelt, bis die Zellverklebungen gelöst sind ($\frac{1}{2}$ –2 h), ohne dass die Zellen wesentlich ladiert werden. Da die Leukozyten spezifisch leichter sind als Tetrachlorkohlenstoff, bleiben sie nach dem Schütteln in Suspension, während das schwerere Na₂SO₄ rasch sedimentiert. Die suspendierten neutrophilen und eosinophilen Granulozyten lassen sich jetzt auf Grund des spezifischen Gewichtes voneinander trennen. Dazu werden durch verschiedenes Mischungsverhältnis aus Tetrachlorkohlenstoff und Petroläther Lösungen vom spezifischen Gewicht 1,25; 1,30; 1,325; 1,35; 1,40 hergestellt. Allen Mischungen wird eine Spur Lezithin beigegeben, gerade so viel, bis eine kaum sichtbare gelbliche Tinktion erreicht wird. Erfahrungsgemäss kann dadurch in der Folge ein erneutes Verklumpen der Leukozyten vermieden werden.

Mischung von spezifischem Gewicht	cm ³ Tetrachlorkohlenstoff	cm ³ Petroläther
1,4	80	20
1,35	77,5	22,5
1,325	72,5	27,5
1,30	70	30
1,25	65	35

Als Trennungsfüssigkeiten hält man sich die laut Tabelle lezithinhaltigen Tetrachlorkohlenstoff-Petroläther-Mischungen vorrätig.

Die Mischungen werden in einem 100 cm³-Messzylinder hergestellt. Für das Schichtverfahren reicht die so erzielte Genauigkeit aus.

In einem Zentrifugenrohr von 1 bis 1 $\frac{1}{2}$ cm Weite und 10 cm Länge werden nun etwa 2 cm³ der Leukozytensuspension mit einer Flüssigkeitssäule von fallendem spezifischem Gewicht überschichtet. Die Übergänge des spezifischen Gewichtes müssen möglichst fliessend sein, was am besten mit folgender Technik erreicht wird: Um eine bessere Durchmischung zu gewährleisten, wird beim Übersichten jeder Portion noch eine kleine Menge des Gemisches mit dem nächst höheren spezifischen Gewicht nachgegossen, so dass sich beim Einfüllen folgende Reihenfolge ergibt: zuunterst 2 cm³ Leukozytensuspension, dann etwa 1,5 cm³ s 1,4; etwa 1,5 cm³ s 1,35; etwa 0,5 cm³ s 1,4; etwa 1,5 cm³ s 1,33; etwa 0,5 cm³ s 1,35; etwa 1,5 cm³ s 1,30; etwa 0,5 cm³ s 1,33; etwa 1,5 cm³ s 1,25; etwa 0,5 cm³ s 1,30; zuoberst etwas Petroläther. Nun wird mit einem dünnen Metalldraht horizontal ziemlich kräftig umgerührt, so dass durch eine gewisse Vermischung ein fliessender Übergang s 1,4–s 1,25 entsteht. Dann wird das Röhrchen verkorkt und 5 min bei einer Tourenzahl von 3000/min zentrifugiert. Die Zellen stellen sich dabei nach ihrem spezifischen Gewicht in einer entsprechenden Schichthöhe ein, wobei das spezifische Gewicht der Eosinophilen um 1,33 liegt. Die Fraktion der Eosinophilen ist meist an einem leicht gelblichen Farbton zu erkennen und liegt direkt oberhalb der Neutrophilen. Die Eosinophilen müssen sehr sorgfältig mittels einer fein ausgezogenen, rund 2 cm³ fassenden Pipette und einer mechanischen Abzugsvorrichtung herauspipettiert werden¹.

Ist der Reinheitsgrad noch nicht genügend, werden die Zellen nach Zugabe von Petroläther zu Boden zentrifugiert und demselben Schichtungsverfahren erneut unterworfen, bis eine Zellsuspension gewonnen wird, die zu 80–100% aus Eosinophilen besteht. Die Zellen sind bei sorgfältigem Arbeiten morphologisch intakt, zeigen unveränderte Färbbarkeit und sind in fixiertem Zustand sehr lange haltbar. Durch Überführen in den rasch verdunstenden Petroläther lassen sie sich trocknen und als weisses Pulver gewinnen.

2. Gewinnung eosinophiler Granula. Werden die Zellen in Tetrachlorkohlenstoff und Na₂SO₄ auf die oben beschriebene Art in der Schüttelmaschine behandelt, so können die Zellmembranen leicht zerstört und die eosinophilen Granula in Suspension gebracht werden, sofern intensiver und länger geschüttelt wird. Je nach der Apparatur sind dazu 8–12 h notwendig. Die Granula werden danach durch das angegebene Schichtungsverfahren isoliert. Es gelingt, aus 800 cm³ Pferdeblut rund 50 mg Trockensubstanz an eosinophilen Granula zu gewinnen.

M. BEHRENS und H. R. MARTI

Physiologisches Institut der Medizinischen Akademie der Justus-Liebig-Hochschule, Giessen, und Medizinische Universitätsklinik, Zürich, den 2. März 1954.

Summary

A method is described for isolation of eosinophilic leucocytes and their granula. The separation from the other cellular elements of blood is based on the differential specific weight.

¹ Pipettier Vorrichtung und Schüttelmaschine sind durch die Firma Otto Kobe, Marburg an der Lahn, zu beziehen.

Die Erforschung der Wirkstoffe des Mutterkorns beschäftigte namhafte Chemiker und Apotheker während Jahrzehnten. Einen ersten Markstein bedeutete die Entdeckung und Reindarstellung des Alkaloids Ergotamin in den Laboratorien der Sandoz A.G., wo in der Folge auch die Auffindung und Herstellung weiterer für die Medizin äusserst wertvoller Mutterkorn-Reinalkaloide gelang. Neue therapeutische Aspekte eröffnete die erstmals bei Sandoz erfolgte Hydrierung dieser Stoffe. Folgende Präparate sind das Ergebnis dieser Forschungen:

Cafergot

Dihydroergotamin-Sandoz

Gynergen

Hydergin

Methergin

Neo-Gynergen

Partergin



S A N D O Z A. G.

Eine Monographie über den Stand der Mutterkorn-Forschung steht Interessenten zur Verfügung.

Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

Reihe der experimentellen Biologie

Pflanzliche Infektionslehre

Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenpathologie. Von Prof. Dr. E. GÄUMANN, ETH., Zürich.
681 Seiten mit 467 Figuren (2. Auflage 1951). Ganzleinen Fr. 46.30.

Einführung in die physiologische Embryologie

Von Prof. Dr. F. E. LEHMANN, Universität Bern. 414 Seiten mit 132 Figuren
und 17 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 39.50.

Die Signalübermittlung im Nerven

Von Prof. Dr. A. VON MURALT, Universität Bern. 354 Seiten mit 132 Figuren,
3 mehrfarbigen Tafeln und 24 Tabellen (1946). Ganzleinen Fr. 43.70.

Die Pilze

Grundzüge ihrer Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Von Prof. Dr. ERNST
GÄUMANN, ETH., Zürich. 382 Seiten mit 440 Figuren (1949). Ganzleinen Fr. 39.50.

Grundriss zu einer Balneobiologie der Thermen

Von Prof. Dr. VALE VOUK, Universität Zagreb. 88 Seiten mit 22 Figuren (1950).
Ganzleinen Fr. 14.55.

Vergleichende Physiologie

in 6 Bänden. Von Prof. Dr. W. VON BUDDENBROCK, Universität Mainz.

Band I: *Physiologie der Sinnesorgane*. 504 Seiten mit 256 Figuren (1952). Ganzleinen Fr. 45.75. – Band II:
Physiologie des Nervensystems. 396 Seiten mit 185 Figuren (1953). Ganzleinen Fr. 38.50. – Band III: *Ernährungs-
physiologie*. Befindet sich in Vorbereitung. Band IV: *Hormone*. 492 Seiten, 115 Figuren und 106 Tabellen.
(1950) Ganzleinen Fr. 49.40. Die Bände V und VI befinden sich ebenfalls in Vorbereitung.

Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen

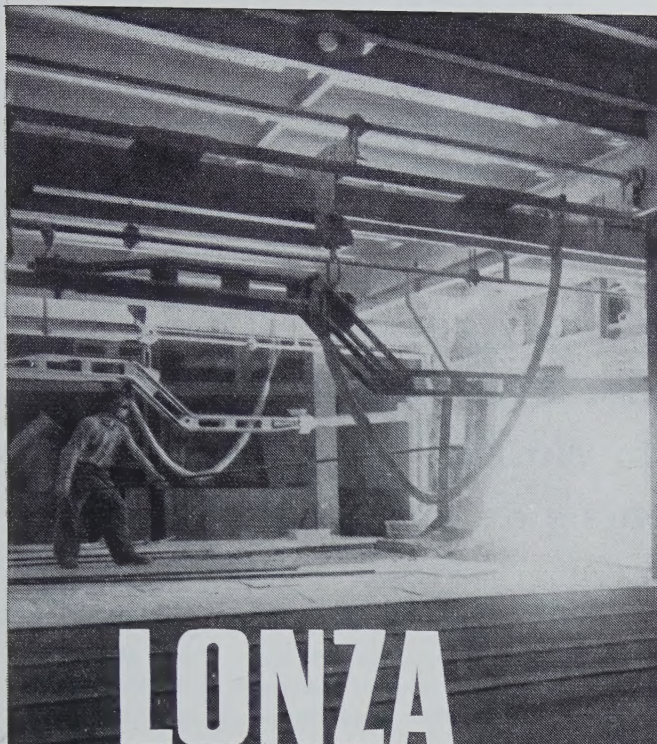
Von Prof. Dr. P. BUCHNER, vormals Universität Leipzig. 771 Seiten mit 335 Figuren und 3 Tafeln.
(1953) Ganzleinen Fr. 66.50.

Planen und Auswerten von Versuchen

Eine Einführung für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure. Von Prof. Dr. Arthur Linder, Pro-
fessor für mathematische Statistik an der Universität Genf und an der Eidgenössischen Technischen Hoch-
schule in Zürich. 182 Seiten mit 9 Figuren, Ganzleinen Fr. 21.–. Broschiert Fr. 17.50 (1953).

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung

Verlag Birkhäuser · Basel/Stuttgart



LONZA

ELEKTRIZITÄTWERKE UND CHEMISCHE FABRIKEN · AKTIENGESELLSCHAFT · BASEL

Calcium-Carbid für Beleuchtungs-, Heiz- und Schweißzwecke

Metallegierungen: Ferrosilicium, Reinsilicium, Ferro-Silico-Aluminium, Ferro-Silico-Aluminium-Mangan, Silicium-Calcium-Aluminium, Calcium-silicium

Graphit

Künstliche Schleifmittel: Siliciumcarbid, Lonsicar (Siliciumcarbid) für Hartbeton

Stickstoff-Dünger: Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Ammonsulfat, Kalkstickstoff

Komplex-Dünger: Nitrophosphat, Nitrophosphat-kali, Volldünger, Composto Lonza

Chemische Produkte: Formaldehyd, Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Paraldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Dicyandiamid, Guanidinnitrat, Ammoniak, Salpetersäure, Nitriersäure, Natriumnitrit, Natriumnitrat, Harnstoff, Ammonnitrat, Nitrobenzol, Anilinöl, Vinylacetat monomer

Organische Lösungsmittel: Aceton, Aethylacetat, Methyl- und Butylalkohol und deren Acetate, Speziallösungsmittel

Cellulose-Acetat

Vinylharze: Polyvinylchlorid, Polyvinylacetat, Polyvinylalkohol, Mischpolymerisate

Helvetica Physiologica et Pharmacologica Acta

Seit 1943 offizielles Publikationsorgan des Schweiz. Vereins der Physiologen und Pharmakologen

Fasc. 1, 1954, enthält folgende Arbeiten:

R. SULZER: L'influence de la dénaturation de l'albumine sur le pouvoir d'aggrégation érythrocytaire.
A. PLETSCHER und P. VON PLANTA: Beeinflussung von Fructose- und Glucosestoffwechsel des isolierten Zwerchfells durch Cortison. P. G. WASER und OLGA VOLKART: Wirkung von Herzglykosiden auf Actomyosin. D. VON CAPELLER: Mechanismen der gegenseitigen Anpassung von Lungen- und Körperkreislauf. E. CORABOEUF und S. WEIDMANN: Temperature Effects on the Electrical Activity of Purkinje Fibres. E. EICHENBERGER und R. HIRT: Über die Wirkung von Brenzkatechinen und Chinonen auf die Kapillaraktivität von sekundären Phosphorsäureestern und das Eiereiweissödem der Ratte. E. FLÜCKIGER und F. VERZÁR: Der Einfluss des Kohlenhydratstoffwechsels auf den Natrium- und Kaliumaustausch des überlebenden Muskels. E. FLÜCKIGER und F. VERZÁR: Die Wirkung von Corticosteroiden auf den Natrium- und Kaliumaustausch des Muskels normaler Tiere.

Preis des Jahresabonnements

Fr. 40.—, zuzüglich Porto. Vorzugspreis für wissenschaftliche Institute Fr. 33.50, zuzüglich Porto.

Abonnemente nimmt Ihr Buchhändler entgegen oder der

VERLAG BENNO SCHWABE & CO, BASEL 10

VERLAG BIRKHÄUSER

BASEL / STUTTGART

EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM - I

Gegenwartsprobleme der Ernährungsprobleme
Present Problems in Nutrition Research
Les problèmes actuels de la nutrition

SYMPOSIUM BASEL, 1.-4. X. 1952

Unter dem Patronat der Internationalen Union der Ernährungswissenschaften - Under the auspices of the International Union of Nutrition Sciences - Sous le patronage de l'Union internationale des sciences de la nutrition - Direction: F. Verzář - Organisation: Experientia

Beiträge: E. ABRAMSON, W. R. AYKROYD, K. BERNHARD, A. B. L. BEZNAK, E. J. BIGWOOD, H. D. CREMER, D. P. CUTHBERTSON, H. DAM, V. DEMOLE, S. J. FOLLEY, L. J. HARRIS, O. HÖGL, K. LANG, K. THOMAS, J. TRÉMOLIÈRES, A. G. VAN VEEN, A. I. VIRTANEN, H. KRAUT, J. KÜHNAU, S. MARKEES, T. H. MOORE, A. SCHÜRCH, J. C. SOMOGYI, F. TERROINE etc.

Ganzleinenband - Full cloth - Relié en toile - (1953) - 312 Seiten. Fr. 32.— (DM 32.—)

Es ist kein Geheimnis, dass die üblichen Kongresse mit ihren vorbestellten und von langer Hand vorbereiteten «Diskussionsbemerkungen» vor einem nach Hunderten und Tausenden zählenden Publikum zur Klärung wissenschaftlicher Streitfragen nichts beitragen. Dass eine solche Klärung in einem kleinen Kreis von Sachverständigen, die ohne propagandistische Nebenabsichten wirklich miteinander diskutieren, durchaus möglich ist und für alle Beteiligten fruchtbar sein kann, zeigt der vorliegende Bericht. Hier referiert jeweils ein Sachverständiger über Dinge, mit denen er sich in intensiver Arbeit jahrelang forschend beschäftigt hat, und die Diskussionsbemerkungen beweisen, dass auch die Zuhörer nur durch Sachkenntnis, Kritik und Bemühung um Erkenntnis bestimmt wurden. Im einzelnen kann auf den Inhalt der Referate und Diskussionsbemerkungen nicht eingegangen werden; in gedrängter Kürze lässt sich die Fülle des Stoffes auch nicht annähernd erfassen. (H. GLADEL, *Klinische Wochenschrift*)

This universality is strikingly reflected in the volume summarizing the proceedings of the Symposium on Present Problems in Nutrition Research that was held in Basel. This book, ably edited by F. VERZÁŘ, presents some 20 talks given by well known European nutritionists as well as the discussions that followed each talk. Particularly outstanding, in the opinion of this reviewer, were the presentations of TREMOLIÈRES (Surveys of Food Attitudes and Habits); CUTHBERTSON (Microbiology of Digestion); BIGWOOD (Free and Combined Amino Acids in Foodstuffs); KARL THOMAS (Utilization of Synthetic Fats); ABRAMSON (Chemicals in Foods and Their Control by Health Authorities); DAM (Vitamin E as an Antioxidant); FOLLEY (Practical Possibilities of Use of Hormones in Nutrition); BEZNĀK (Relation of Dietary Fat to Work and Growth); and DEMOLE and CREMER (Present day knowledge of Dietary Role of Fluorine and Other Minerals). W. R. AYKROYD, the director of the Nutrition Division of the Food and Agriculture Organization, gave a lucid and comprehensive review of the nutrition work of FAO. A. G. VAN VEEN, also of FAO, discussed the question of satisfactory protein sources for supplementary child-feeding programs, a point of great importance now that Kwashiorkor (protein deficiency syndrome) is emerging as the most urgent world wide nutrition problem.

The book, attractively printed, represents an excellent cross section of present-day problems and is a valuable addition to the nutritionist's library. (J. MAUER, *American Association for the Advancement of Science*)